

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PARTICIPACIÓN DE LIPASAS EN EL FENÓMENO DE
FARMACORRESISTENCIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
*Mycobacterium tuberculosis***

POR

M. EN C. ANA LETICIA ARRIAGA GUERRERO

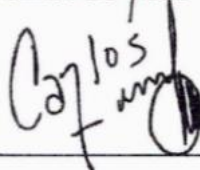
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

Junio 2021

PARTICIPACIÓN DE LIPASAS EN EL FENÓMENO DE
FARMACORRESISTENCIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE

Mycobacterium tuberculosis

Comité de Tesis



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Presidente



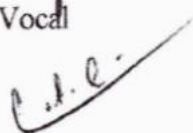
Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Secretario



Dra. Katia Peñuelas Urquides

Vocal



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Vocal



Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirector de posgrado

“PARTICIPACIÓN DE LIPASAS EN EL FENÓMENO DE
FARMACORRESISTENCIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
Mycobacterium tuberculosis”

Dirección de tesis



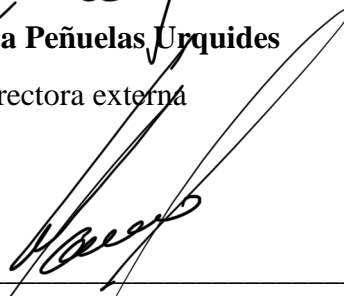
Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Director interno



Dra. Katia Peñuelas Urquides

Directora externa



Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León

Asesor externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Investigación en Salud, R-2017-785-123
FIS/IMSS/PROT/G18/1814

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Fondo de Investigación en Salud por el apoyo económico otorgado para la realización de estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, principalmente a la Facultad de Ciencias Biológicas por los conocimientos brindados.

A los doctores Carlos E. Hernández Luna y Mario A. Bermúdez de León, por abrirme las puertas de su laboratorio, por resolver mis dudas y por estar siempre que necesitaba su ayuda. A la doctora Katia Peñuelas, por su dedicación, esfuerzo, consejos y por guiarme en el desarrollo de esta tesis, así como de la investigación.

A mis Padres y hermanos por ser un apoyo incondicional y confiar en mí. Son la mejor familia que hubiera soñado.

A mis compañeros de laboratorio, Ana Laura, Alejandra, Laura, Jorge, Paulina, Alain, Nefertari, Dulce, José Guadalupe, Gladis, Aurora y a todos los que estuvieron en el LBM durante estos seis años, fueron unos excelentes compañeros, amigos y un gran equipo.

A mis amigos que fueron un gran pilar tanto emocional como los que me brindaron sus consejos para que pudiese terminar esta tesis. Muchas gracias a Nadia, Servando, Mariela, Aglaé, Miriam, Javier, Cristina, Sergio y especialmente a Annete por siempre ser mi oído, mi hombro y mi apoyo.

DEDICATORIA

Para las dos personas más importantes de mi vida, mis padres, soy quien soy gracias a ustedes, por su dedicación, esfuerzo y por los valores que me brindaron. Siempre estaré agradecida con ustedes.

A la niña que alguna vez fui, que sentía pasión por la ciencia, a la adolescente que decidió hacer investigación y a la mujer que nunca se rindió hasta cumplir su sueño de realizar un doctorado.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	xv
RESUMEN.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
2.2 Tuberculosis	4
2.2.1 Epidemiología.....	10
2.2.2 Tratamiento.....	11
2.2.2.1 Fármacos de primera línea	12
2.2.2.2 Fármacos antimicobacterianos de segunda línea.....	15
2.2.3 Farmacorresistencia	15
2.2.3.1 Tipos de farmacorresistencia.....	17
2.2.3.1.1 Resistencia adquirida.....	17
2.2.3.1.2 Resistencia intrínseca	20
2.2.3.1.2.1 Resistencia de la pared celular.....	20
2.2.4 Lipasas de <i>M. tuberculosis</i>	23
2.2.4.1 Lipasas asociadas a farmacorresistencia	24
2.2.5 Modelos experimentales de <i>Mycobacterium</i>	29
2.2.5.1 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	29
3. JUSTIFICACIÓN	33
5.1 Objetivo General	35
5.2 Objetivos Específicos	35

6. MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1 Cultivo y Mantenimiento de <i>M. smegmatis</i>	36
6.2 Extracción de DNA genómico de <i>M. smegmatis</i>	36
6.3 Sobreexpresión de Lipasas en <i>M. smegmatis</i>	37
6.3.1 Amplificación de la región codificante de las lipasas	37
6.3.2 Clonación de la región codificantes de las lipasas en el vector pEXP5-CT/TOPO	38
6.3.3 Subclonación de las regiones codificantes en el vector pMV261	39
6.3.3.1 Transformación de la cepa <i>E. coli</i> DH5 α	40
6.3.3.2 Caracterización de las construcciones plasmídicas	41
6.4 Extracción de DNA plasmídico por Minipreparación de lisis alcalina	41
6.5 Sobreexpresión de lipasas en <i>M. smegmatis</i>	42
6.6 Purificación del DNA de las construcciones plasmídicas	42
6.7 Extracción de RNA de <i>M. smegmatis</i>	43
6.8 Evaluación de la sobreexpresión e inhibición de las lipasas	44
6.8.1 Tratamiento de RNA total con DNasa I	44
6.8.2 Retrotranscripción	44
6.8.3 Rango dinámico de amplificación	45
6.8.4 Cuantificación relativa de la expresión de las lipasas	45
6.9 Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando lipasas en la condición de resistencia a fármacos	45
6.9.1 Actividad de fármacos en las transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226	46
6.9.2 Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>M. smegmatis</i> con los fármacos RIF, INH y STR	47
6.9.3 Unidades formadoras de colonias en medio conteniendo RIF e INH	47

6.10 Evaluación de la morfología colonial de las cepas sobreexpresando lipasas	48
6.11 Silenciamiento de diferentes lipasas en <i>M. smegmatis</i>	48
6.11.1 Diseño de RNA guía para la inhibición de lipasas	48
6.11.2 Realización de la construcción pLJR962-RNAg_LipH	49
6.11.3 Caracterización de las construcciones pLJR92-RNAg_LipH	50
6.12 Inhibición de la lipasa LipH en <i>M. smegmatis</i>	51
6.13 Análisis estadístico	51
7. RESULTADOS.....	52
7.1 Silenciamiento de la región codificante de lipasas en <i>M. smegmatis</i>	52
7.1.1 Caracterización del vector pLJR962.....	52
7.1.2 Diseño de RNA guías para la inhibición de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226	52
7.1.3 Realización y caracterización de la construcción pLJR962-mmpL3.....	53
7.1.4 Realización y caracterización de la construcción pLJR962-LipH y pLR962- Ctrl	54
7.1.5 Inhibición de la lipasa LipH en <i>M. smegmatis</i>	58
7.2.1 Sobreexpresión de lipasas en <i>M. smegmatis</i>	58
7.2.1.1 Amplificación de la región codificante de las lipasas LipG, LipH, LipU, MSMEI_6226 de <i>M. smegmatis</i>	58
7.2.1.2 Clonación de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en el vector pEXP5-CT TOPO	60
7.2.1.3 Subclonación de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en el vector pMV261	61
7.2.1.4 Generación de transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226.....	64
7.2.2 Comprobación de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en <i>M. smegmatis</i>	65

7.3 Evaluación de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i>	75
7.3.1 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en <i>M. smegmatis</i> en la condición de resistencia a fármacos mediante el ensayo REMA.....	75
7.3.2 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en <i>M. smegmatis</i> en la condición de resistencia a fármacos mediante cinéticas de crecimiento.....	77
7.4.2.1 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipG en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i> mediante cinéticas de crecimiento.....	79
7.4.2.2 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipH en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i> mediante cinéticas de crecimiento.....	81
7.4.2.3 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipU en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i> mediante cinéticas de crecimiento.....	85
7.4.2.4 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa MSMEI_6226 en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i> mediante cinéticas de crecimiento	87
7.4.2.5 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipH en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i> mediante unidades formadoras de colonias	90
7.4 Evaluación de la morfología colonial de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226.....	92
8. DISCUSIÓN	96
8. CONCLUSIONES	101
9. PERSPECTIVAS	102

10. BIBLIOGRAFÍA	103
11. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	116
12. ANEXOS	117

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de fármacos usados para el tratamiento de la tuberculosis.....	15
Tabla 2. Principales genes involucrados en la resistencia a fármacos de primera línea en <i>M. tuberculosis</i>	17
Tabla 3. Lipasas de <i>M. tuberculosis</i> ortólogas en <i>M. smegmatis</i>	30
Tabla 4. Primers usados para la amplificación de la región codificante de las lipasas....	38
Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación de la región codificante de las lipasas	38
Tabla 6. Rango de concentración de los fármacos en el método de microdilución en placa para <i>M. smegmatis</i>	46
Tabla 7. Diseño de RNA guías para inhibir lipasas de <i>M. smegmatis</i> por CRISPRi.....	49
Tabla 8. Efecto de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i>	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología microscópica y macroscópica de <i>M. tuberculosis</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 3. Descripción esquemática del granuloma	6
Figura 4. Manifestaciones clínicas de Tuberculosis	8
Figura 5. Fases en la progresión de la Tuberculosis.	9
Figura 6. Incidencia Mundial de TB	10
Figura 7. Incidencia de TB en México.....	11
Figura 8. Proceso de transtraducción y mecanismo de acción de PZA.	14
Figura 10. Representación esquemática de los elementos estructurales de la RNA polimerasa incluyendo la región determinante a la resistencia a RIF (RDRR).	19
Figura 11. Estructura de la pared micobacteriana	22
Figura 12. Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	23
Figura 13. Expresión diferencial de genes en una cepa pansensible H37Rv (pansensitive strain) y un aislado clínico MFR (MDR isolate).....	26
Figura 14. Expresión diferencial del gen <i>lipF</i> en aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> con diferentes perfiles de resistencia a fármacos.	27
Figura 15. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> expresando LipF en presencia de rifampicina (RIF) y estreptomina (STR).	28
Figura 16. Diseño del fragmento de DNA sintético contiendo los guías de las lipasas...50	
Figura 17. Caracterización del vector pLJR962 mediante digestión enzimática usando <i>Apal</i>	52
Figura 18. Identificación de la construcción pLJR962-RNAg_mmpL3 mediante PCR..53	
Figura 19. Secuencia nucleotídica de la construcción pLJR962-RNAg_mmpL3 del candidato 1.	54
Figura 20. Caracterización de los candidatos pLJR962-LipH en <i>E. coli</i>	55
Figura 21. Caracterización de los candidatos pLJR962-Ctrl en <i>E. coli</i>	55
Figura 22. Secuencia nucleotídica de la construcción pLJR962-LipH del candidato 1...56	
Figura 23. Secuencia nucleotídica de la construcción pLJR962-Ctrl del candidato 1.....56	
Figura 24. Caracterización del candidato 3 de <i>M. smegmatis</i> pLJR962-LipH.	57
Figura 25. Caracterización del candidato 3 de <i>M. smegmatis</i> pLJR962-Ctrl.	58

Figura 26. Amplificación de la secuencia codificante de LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 de <i>M. smegmatis</i>	59
Figura 27. Amplificación de las secuencias codificantes de LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 a partir de candidatos en el vector pEXP5-CT TOPO	60
Figura 28. Secuencia nucleotídica codificante de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI 6226 a partir de las construcciones de en el vector pEXP5-CT TOPO	61
Figura 29. Digestión enzimática de las construcciones pEXP5-CT TOPO-LipG, pEXP5-CT TOPO-LipH, pEXP5-CT TOPO-LipU, pEXP5-CT TOPO-MSMEI_6226 y del vector pMV261.	62
Figura 30. Caracterización de las construcciones plasmídicas con lipasas en pMV261 mediante PCR.	63
Figura 31. Concentración, pureza e integridad de las construcciones con las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en el vector pMV261.....	64
Figura 32. Cultivos de cepas de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando las lipasas LipG, LipU, LipH y MSMEI_6226.	65
Figura 33. Extracción de RNA total con tratamiento de DNasa de las transformantes de <i>M. smegmatis</i>	66
Figura 34. Comprobación de la eliminación de DNA de la muestra de RNA total utilizado en la reacción de retrotranscripción	67
Figura 35. Amplificación de <i>sigA</i> para comprobar funcionalidad del cDNA de las transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU, MSMEI_6226.	68
Figura 36. Rango dinámico de amplificación para el gen <i>sigA</i> de <i>M. smegmatis</i>	69
Figura 37. Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia del gen <i>sigA</i> de <i>M. smegmatis</i>	70
Figura 38. Sobreexpresión de LipG en <i>M. smegmatis</i>	71
Figura 39. Sobreexpresión de LipH en <i>M. smegmatis</i>	72
Figura 41. Sobreexpresión de MSMEI_6226 en <i>M. smegmatis</i>	74
Figura 42. Evaluación de la sobreexpresión de lipasas en la resistencia a RIF, INH y EMB en <i>M. smegmatis</i>	76
Figura 43. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> transformada, en medio conteniendo kanamicina como fármaco de selección.	78

Figura 44. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipG en medio líquido conteniendo el fármaco RIF.....	80
Figura 45. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipG en medio líquido conteniendo el fármaco INH.....	81
Figura 46. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipH en medio líquido conteniendo el fármaco RIF.....	83
Figura 47. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipH en medio líquido conteniendo el fármaco INH.	84
Figura 48. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipH en medio 7H9 conteniendo el fármaco STR.....	85
Figura 49. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipU en medio 7H9 conteniendo el fármaco INH.	86
Figura 50. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando MSMEI_6226 en medio 7H9 conteniendo el fármaco RIF.....	88
Figura 51. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando MSMEI_6226 en medio 7H9 conteniendo el fármaco INH.	89
Figura 52. Unidades formadoras de colonia de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipH en cultivos conteniendo el fármaco INH.	91
Figura 53. Unidades formadoras de colonia de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipH en cultivos conteniendo el fármaco RIF.	91
Figura 54. Morfología colonial de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipG.....	92
Figura 55. Análisis cuantitativo de la morfología colonial de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipG.	93
Figura 56. Morfología colonial de las transformantes de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipH, LipU y MSMEI_6226.....	94
Figura 57. Análisis cuantitativo de la morfología colonial de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando LipH, LipU y MSMEI_6226.....	95

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grado Centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µFD	Microfaradio
AAR	Ácido Alcohol Resistente
ACF	Adjuvante Completo de Freund
ADC	Albumina bovina, dextrosa, catalasa, del inglés <i>bovine Albumin, Dextrose, Catalase</i>
ATc	Anhidrotetraciclina
ATP	Adenosina trifosfato
BSSL	Lipasa activada por sales biliares, del inglés <i>Bile salt-stimulated lipase</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
dDDH	Hibridación digital DNA-DNA, del inglés, <i>Digital DNA-DNA hybridization</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés <i>Desoxyribonucleic acid</i>
D.O.	Densidad óptica
EMB	Etambutol
g	Gramo
RNAg	RNA guía
h	Hora
HSL	Lipasa sensible a hormonas, del inglés <i>Hormone sensitive lipase</i>
kDa	Kilodalton
kV	Kilovoltios

IL-6	Interleucina 6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INH	Isoniazida
LB	Luria Bertani
M	Molar
MABA	Microdilución en placa usando el compuesto alamar azul, del inglés <i>Microtitter alamar blue assay</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFR	Multifármacorresistente
mRNA	RNA mensajero
MTC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , del inglés <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamida adeninadinucleótido
OADC	Ácido oleico, albumina bovina, dextrosa, catalasa, del inglés <i>Oleic acid, bovine Albumin, Dextrose, Catalase</i>
Ohms	Ohmio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial de hidrógenos

PI	Punto isoelectrico
POA	Ácido pirazinoico
PZA	Pirazinamida
RDRR	Región determinante de resistencia a rifampicina
REMA	Microdilución en placa usando el compuesto resazurina, del inglés <i>Resazurin microtiter assay</i>
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés <i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
s	Segundo
STR	Estreptomina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculosis
TBE	Tuberculosis extrapulmonar
TB-MFR	Tuberculosis Multifarmacorresistente
TBP	Tuberculosis pulmonar
TLR	Receptores tipo Toll, del inglés <i>toll like receptors</i>
Tm	Temperatura de fusión, del inglés <i>Temperature melting</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UGT	Uridina difosfato glicosiltransferasa
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida

RESUMEN

La bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es comúnmente el agente causal de la tuberculosis. Recientemente han surgido cepas farmacorresistentes lo cual ha complicado el control y tratamiento de la enfermedad. Regularmente, esta resistencia se ha asociado a la presencia de mutaciones. Sin embargo, es probable que existan otros mecanismos involucrados. Uno de estos mecanismos podría ser la resistencia intrínseca de la pared de las micobacterias que funciona como una barrera para la penetración de antibióticos, y otro fenómeno más es la expresión diferencial de genes. Previamente nuestro grupo de investigación realizó un estudio en donde se comparó el perfil de expresión génica de una cepa sensible y un aislado clínico multifarmacorresistente de *M. tuberculosis*, en donde se encontró la expresión diferencial de 8 genes, de los cuales el gen *lipF*, que codifica para una lipasa, mostró una disminución en su expresión en el aislado multifarmacorresistente. Al expresar esta lipasa en una cepa modelo de *Mycobacterium tuberculosis* se observó que la expresión de *lipF* aumenta la sensibilidad a los fármacos rifampicina y estreptomicina, por lo tanto, una menor expresión de este podría estar relacionado con la resistencia a estos fármacos en *M. tuberculosis*. A la fecha se han identificado 30 lipasas presuntivas en *M. tuberculosis*, y se han localizado 19 lipasas ortólogas en la cepa *M. smegmatis* (ampliamente utilizada como modelo experimental de *M. tuberculosis*). Actualmente se desconocen los mecanismos por los cuales se regula la expresión de estas lipasas, y debido a que están involucradas en la síntesis de la pared celular, consideramos que éstas podrían ser un factor importante en el fenómeno de farmacorresistencia. En este estudio se identificó que la sobreexpresión de LipG en *M. smegmatis* aumenta la sensibilidad a los fármacos isoniazida y rifampicina, así como LipH modifica la morfología colonial y disminuye el crecimiento en presencia de estreptomicina.

1. INTRODUCCIÓN

La bacteria *M. tuberculosis* es comúnmente el agente causal de la tuberculosis (Guirado *et al.*, 2013). Con el reciente surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* farmacorresistentes, se ha complicado control y tratamiento de la enfermedad (Becerril-Montes *et al.*, 2013; Rattan *et al.*, 1998). Esta resistencia comúnmente ha sido asociada a la presencia de mutaciones. Sin embargo, existen otros mecanismos involucrados como es la resistencia intrínseca de la pared de las micobacterias, la cual funciona como una barrera para la penetración de fármacos por su alto contenido en ácidos micólicos, los cuales son lípidos α -ramificados altamente hidrofóbicos. En 1999, Liu y Nikaido analizaron una mutante de *Mycobacterium* deficiente en la síntesis de ácidos micólicos y encontraron que esta cepa era más sensible a ciertos antimicobacterianos (Nguyen y Thompson, 2006).

Otro fenómeno que podría participar en la farmacorresistencia es la expresión diferencial de genes. Previamente en nuestro grupo de investigación realizó un análisis global comparando el perfil de expresión génica de una cepa sensible y un aislado clínico multifarmacorresistente de *M. tuberculosis*, encontrando una expresión diferencial de genes entre las dos cepas. El gen *lipF* fue uno de los genes que mostró una disminución en su expresión en el aislado multifarmacorresistente (Peñuelas-Urquides, Gonzalez-Escalante, *et al.*, 2013). Con la finalidad de corroborar la participación de estos genes en la farmacorresistencia nuestro grupo realizó un análisis en aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos y diferente fondo genético, y similar a lo observado por Peñuelas-Urquides *et al.* (2013), en estos resultados se identificó que aproximadamente el 90% de las cepas analizadas mostraron una disminución en la expresión de *lipF* (Gonzalez-Escalante *et al.*, 2015). Al expresar esta lipasa en una cepa modelo de *Mycobacterium tuberculosis* se observó que la expresión de *lipF* aumenta la sensibilidad a los fármacos rifampicina y estreptomicina, por lo tanto, una menor expresión de este podría estar relacionado con la resistencia a estos fármacos en *M. tuberculosis* (Arriaga-Guerrero *et al.*, 2020). LipF es una lipasa con función de fosfolipasa C y carboxilesterasa (Chen *et al.*, 2014; Srinivas *et al.*, 2008). *M. tuberculosis* tiene 30 lipasas presuntivas para la síntesis y degradación de lípidos, estas enzimas tienen un papel

importante en el ciclo de vida de la micobacteria (Dedieu *et al.*, 2013). Se han identificado 19 lipasas ortólogas de *M. tuberculosis* en la bacteria *M. smegmatis*, se ha utilizado ampliamente como modelo para la expresión de genes nativos de *M. tuberculosis*, así como para evaluar la función de genes ortólogos, ya que es una micobacteria de rápido crecimiento y con un nivel de manipulación relativamente seguro (BioCyc.org, 2021; Chen *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2005).

Las lipasas LipY, LipC y Rv0183 de *M. tuberculosis* H37Rv se han relacionado con la degradación de lípidos, los cuales pudieran provenir de la membrana de las células del hospedero, y son usados por la micobacteria para la formación de la pared micobacteriana. De igual forma, estas lipasas se han relacionado con la transformación en macrófagos espumosos; los cuales acumulan lípidos que después son usados como una manera rápida de conseguir energía y material para la síntesis de la pared (Brust (Brust *et al.*, 2011; Dedieu *et al.*, 2013). También se ha caracterizado un ortólogo de la lipasa Rv0183 en *M. smegmatis* (MSMEI-0213) teniendo un 68% de identidad con la enzima de *M. tuberculosis* y la misma actividad en la degradación de lípidos, siendo ambas lipasas de monoacilgliceroles (Dhouib *et al.*, 2010). Por lo anterior, debido a que las lipasas están involucradas en la síntesis de la pared celular, consideramos que la participación de éstas podría ser un factor importante en el fenómeno de farmacorresistencia en las micobacterias.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

La bacteria *M. tuberculosis* forma parte del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), el cual está compuesto por seis especies estrechamente relacionadas con distintos tropismos en el hospedero incluyendo al patógeno humano *M. africanum*, y a las especies animales adaptadas *M. caprae* (cabras), *M. bovis* (que infecta a bovinos), *M. microti* (que infecta a roedores) y *M. pinnipedii* (que infecta a focas). Estas especies son altamente similares en sus secuencias genómicas (dDDH= 83.5 – 100) (Riojas *et al.*, 2018). Las bacterias del género *Mycobacterium* no presentan movilidad y su forma es bacilar. *M. tuberculosis* presenta un tamaño de 2-4 μm de longitud y 0.2-0.5 μm de ancho, es un microorganismo aerobio obligado, aunque tiene la facultad de crecer en condiciones de microaerofilia por lo que usualmente se reproduce en el interior de los macrófagos. El tiempo de generación de *Mycobacterium* es de 16 h en condiciones óptimas, lo cual puede contribuir a su supervivencia dentro de los macrófagos (Beste *et al.*, 2009; Zhu y Dai, 2018). El cultivo de este microorganismo se puede llevar a cabo en medios sólidos como el medio Lowenstein Jensen y el agar Middlebrook, en los cuales crece de manera ramificada, formando un micelio no verdadero en forma de cordón (Brock, 2005) (Figura 1).

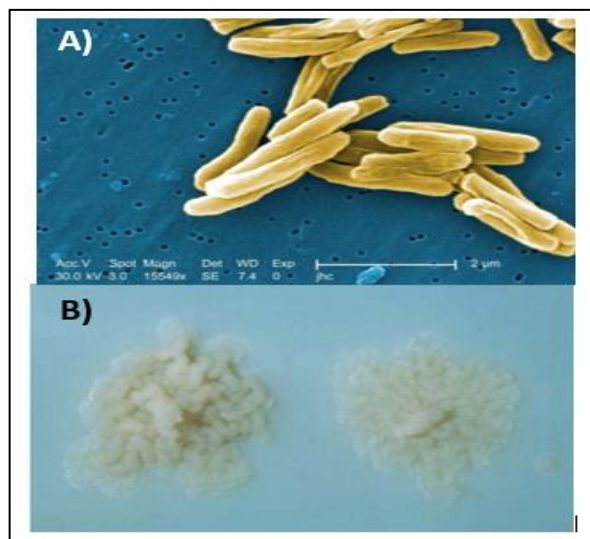


Figura 1. Morfología microscópica y macroscópica de *M. tuberculosis*. Panel A, Micrografía electrónica de barrido mostrando a los bacilos de *M. tuberculosis*. Magnificado 15,549 \times . Panel B, Colonias de *M. tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen. Adaptado de (CDC, 2015).

2.2 Tuberculosis

La bacteria *M. tuberculosis* es el principal agente causal de la tuberculosis (TB), la cual se adquiere mediante la vía respiratoria. La infección se inicia a través de la inhalación de microgotas en aerosoles que contienen el bacilo viable (Guirado *et al.*, 2013). Una microgota contiene entre 1 y 3 bacilos y puede ser altamente eficaz en transmitir la enfermedad dado a que su bajo peso le permite permanecer en el aire durante un largo periodo de tiempo; estas microgotas son generadas al hablar, toser y estornudar (Garza-Velasco *et al.*, 2017). El bacilo es inhalado a través de la nariz y la boca, pasa a la tráquea, bronquios, bronquiolos y eventualmente a los alveolos en los pulmones (Lerner *et al.*, 2015). Una vez dentro del hospedero la bacteria se localiza en los alveolos en donde se activa el reclutamiento de macrófagos, los cuales, son infectados por *M. tuberculosis* produciéndose la multiplicación del bacilo dentro de estas células y un nuevo reclutamiento de macrófagos. Lo anterior permite la formación del granuloma, un organizado complejo de células del sistema inmune que contienen la infección, pero debido a diferentes circunstancias el granuloma puede convertirse en necrótico dirigiendo a la multiplicación de la bacteria y su posterior transmisión a otros individuos (Cambier *et al.*, 2014) (Figura 2).

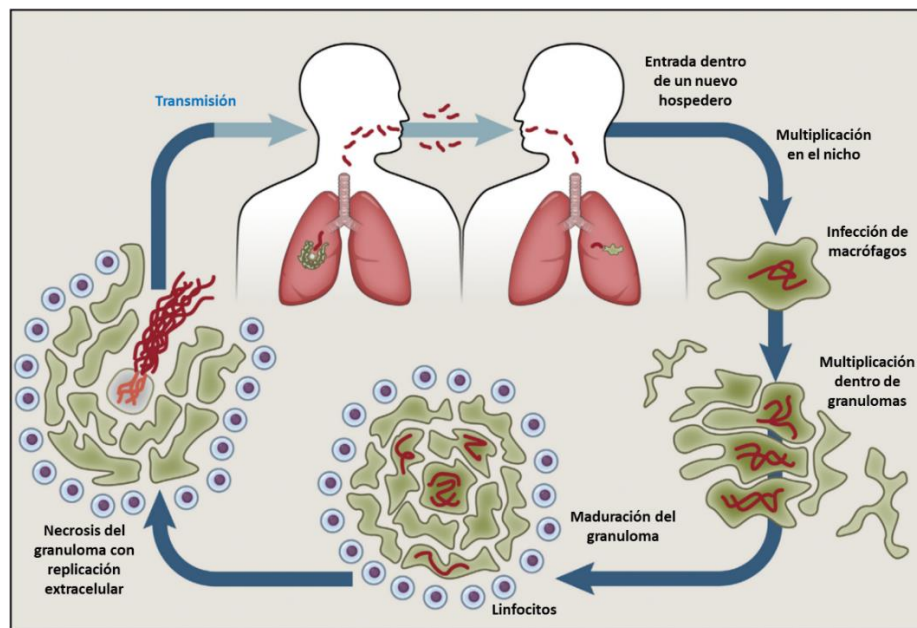


Figura 2. Ciclo de vida de *M. tuberculosis*. Adaptado de (Cambier *et al.*, 2014).

La bacteria *M. tuberculosis* se ha adaptado al humano, siendo considerada como un patógeno intracelular con tropismo hacia los macrófagos, en donde el principal blanco de la infección son los macrófagos alveolares (Guirado *et al.*, 2013). El avance de la enfermedad dependerá de la cantidad de bacilos inhalados, la virulencia de la cepa infectante, así como el estado inmune del hospedero (Garza-Velasco *et al.*, 2017). La tuberculosis puede ser pulmonar, extrapulmonar o ambas. Este microorganismo es sumamente efectivo en evadir al sistema inmune de muchas maneras, siendo esta es la razón por la cual este patógeno presenta una difícil erradicación. La fagocitosis de *M. tuberculosis* por los macrófagos alveolares y células dendríticas desencadena una cascada de citosinas y quimiocinas que estimulan la activación de la fagocitosis y el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares al sitio de infección. La acumulación de estas células del sistema inmune dirige a la formación del granuloma, el cual es una masa celular con una abundante presencia de macrófagos (Figura 3); Cuya función es controlar el crecimiento del bacilo intracelularmente y limitar su diseminación. Los granulomas disminuyen de tamaño y celularidad una vez que el bacilo es controlado y la infección latente es estabilizada (Guirado *et al.*, 2013).

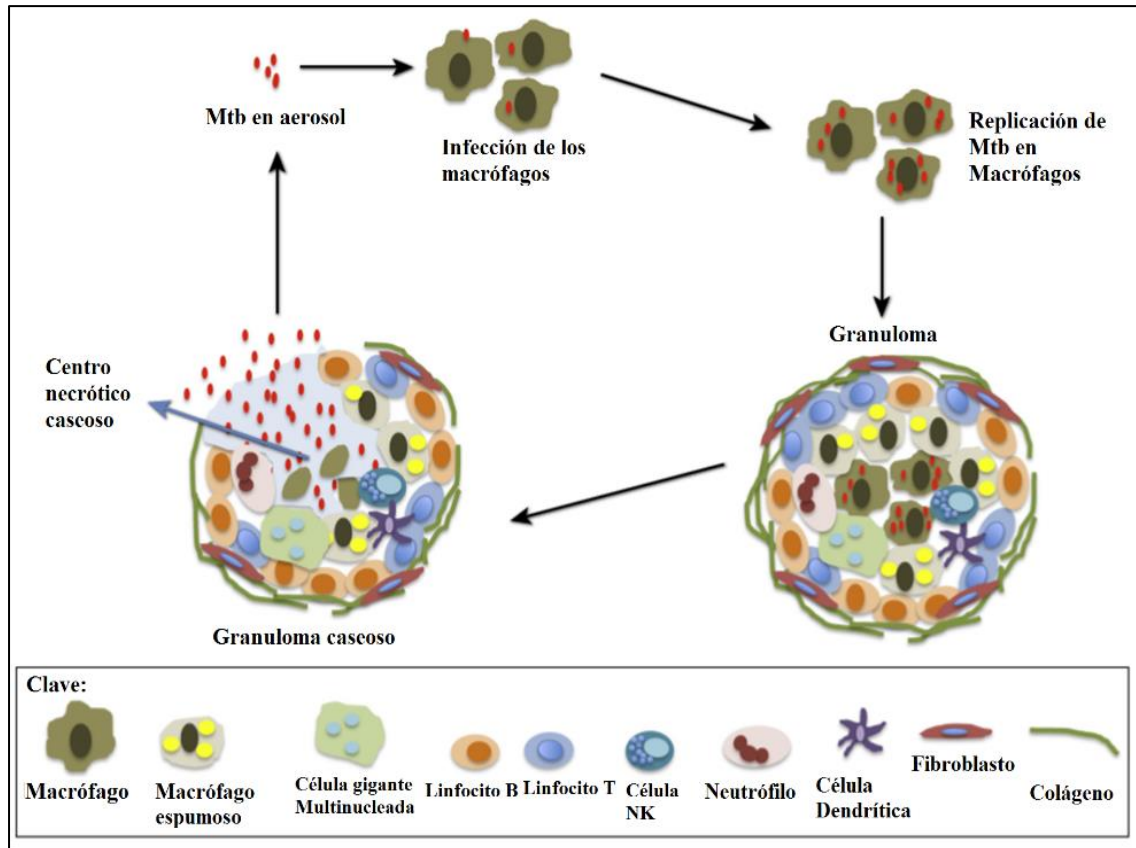


Figura 3. Descripción esquemática del granuloma. Los macrófagos fagocitan a la bacteria *M. tuberculosis*, estos bacilos evaden el sistema inmune y se replican dentro de ellos, posteriormente son rodeadas por células del sistema inmune como linfocitos, neutrófilos, células NK, macrófagos espumosos, además de otras células como fibroblastos y colágeno. Los granulomas restringen la infección y mantienen un estado de latencia. En la tuberculosis activa, el granuloma estalla lo que provoca la liberación del contenido necrótico en donde se encuentran las micobacterias en una etapa conduciendo a la fibrosis y a la destrucción de los tejidos circundantes lo que produce una cavitación y la liberación de *M. tuberculosis*. Adaptado de (Rayasam y Balganes, 2015).

Comúnmente la tuberculosis se clasifica en dos fases, TB activa y TB latente. Dentro de la TB activa, la tuberculosis pulmonar (TBP) es la presentación más común de la enfermedad, puede ser categorizada como infección primaria o post-primaria. La infección primaria ocurre después de la infección inicial con el bacilo, que al no poder ser eliminado por los macrófagos alveolares se multiplica dentro de este ambiente intracelular causando la lisis del macrófago hospedero; El ciclo continúa al ser ingerido por otros macrófagos alveolares y monocitos reclutados del torrente sanguíneo, esta lisis provoca

lesiones que pueden ser observadas mediante una radiografía torácica. El desarrollo de una inmunidad específica es necesaria para limitar la multiplicación del bacilo, que el hospedero permanezca asintomático y se presente la curación de las lesiones. Algunos bacilos pueden permanecer en un estado de dormancia durante muchos años y en una condición conocida como tuberculosis latente. Sin embargo, en aproximadamente el 5% de los individuos la inmunidad es inadecuada y se desarrolla la fase activa de la enfermedad. La coinfección con VIH es uno de los factores de riesgo más importantes para la progresión de la enfermedad hacia una fase activa, otros factores de riesgo incluyen condiciones asociadas con defectos en los linfocitos T y macrófagos, así como desnutrición, abuso de alcohol y drogas, condiciones clínicas coexistentes como lo son falla renal, diabetes, silicosis, entre otras, así como, el uso de corticoesteroides u otras terapias inmunosupresoras. Por estas razones la infección primaria puede ser asintomática o presentar sintomatología como fiebre y ocasionalmente dolor torácico pleurítico, siendo el síntoma más común la presencia de tos crónica (Harrison, 2015; Leung, 1999) (Figura 4A).

La infección post-primaria, también conocida como reactivación o TBP secundaria, resulta de la reactivación endógena de tuberculosis latente o de una reinfección (Figura 4), ocurre en una persona quien previamente había sido infectada y que mantiene cierto grado de inmunidad adquirida; Esto puede ser resultado de una reactivación endógena o menos comúnmente una reinfección exógena. Aunque esta reinfección puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo en la mayoría de los casos se localiza en los pulmones, infectando principalmente a las zonas altas, causando una destrucción de los tejidos provocada por el sistema inmune mediado por células al intentar controlar y resolver la enfermedad (Harrison, 2015; Leung, 1999) (Figura 4B).

La tuberculosis extrapulmonar (TBE) es otra manifestación de la tuberculosis que envuelve otros órganos diferentes al pulmón, como lo son pleura, nódulos linfáticos, abdomen, tracto gastrointestinal, piel, articulaciones, huesos y meninges, aunque puede infectar cualquier órgano del cuerpo humano (Lee, 2015). Tiene una incidencia de aproximadamente 16% de los casos de tuberculosis alrededor del mundo (G. W. H. O. OMS, 2020). Varios factores se han asociado con TBE siendo los más comunes el género

femenino, edad (jóvenes), origen étnico (asiáticos y africanos son más comúnmente asociados) y la presencia de VIH. El diagnóstico se puede realizar únicamente por el cultivo de *Mycobacterium* proveniente de muestras del paciente infectado, dificultando el diagnóstico de esta fase clínica. En la mayoría de los casos se presentan síntomas como fiebre, pérdida de peso, sudores nocturnos, malestar general además de síntomas específicos basados en el órgano afectado. Además, en la TBE se presenta principalmente inflamación indolora de los nódulos linfáticos en los sitios posterior cervical y supraclavicular principalmente (Harrison, 2015; Lee, 2015) (Figura 4C).

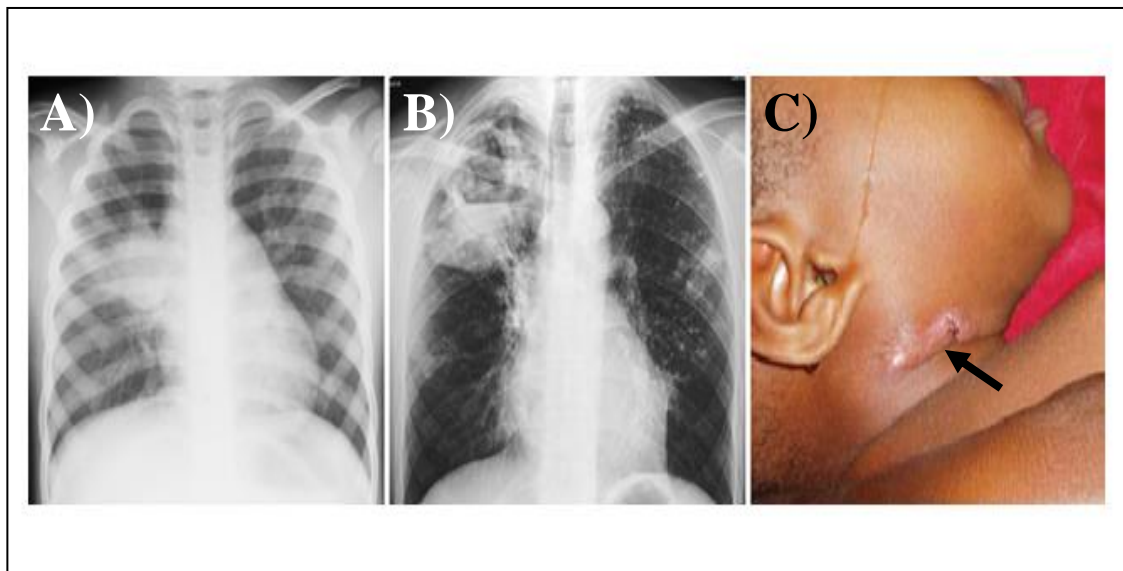


Figura 4. Manifestaciones clínicas de Tuberculosis. A) radiografía torácica mostrando nódulo linfático con infiltración en el pulmón derecho en un niño con tuberculosis primaria. B) Radiografía torácica mostrando infiltrado en el lóbulo superior derecho y una cavidad con nivel de fluido de aire en un paciente con tuberculosis activa. C) Linfadenitis tuberculosa afectando los nódulos linfáticos cervicales. Adaptado de Harrison, 2015.

En la TB latente se encuentran granulomas conteniendo a la bacteria *M. tuberculosis* en un estado inactivo, en donde en individuos inmunocompetentes este estado puede permanecer por décadas (Rayasam y Balganes, 2015). Sin embargo, cuando se manifiesta un sistema inmune comprometido, la respuesta granulomatosa no produce una protección completa, por lo que el bacilo continúa replicándose, conduciendo a la fase activa de la enfermedad (Guirado *et al.*, 2013; Rayasam y Balganes, 2015). Se estima que menos de un 10% de los individuos infectados por *M. tuberculosis* desarrollarán la

enfermedad durante su vida, pero una vez desarrollada y sin un tratamiento adecuado esta puede resultar fatal (Kaufmann, 2001)

Recientemente se ha propuesto la adición de dos estados clínicos de la enfermedad, lo cuales son TB incipiente y TB subclínica. Al presentarse la TB incipiente podemos encontrar a *M. tuberculosis* viable, por lo que en ausencia de un tratamiento oportuno puede progresar a la forma activa de la enfermedad. Sin embargo, en esta fase no se encuentran síntomas clínicos, anormalidades en la radiografía torácica o evidencia microbiológica consistente con una TB activa. Cuando hablamos de TB subclínica podemos observar que, aunque se encuentra la bacteria *M. tuberculosis* viable, esta no causa la sintomatología clínica relacionada con la tuberculosis. Sin embargo, es posible observar otras anormalidades que pueden ser detectadas mediante análisis radiológicos o microbiológicos. De esta manera en fases tardías de la enfermedad se puede progresar de una infección latente (TB latente) a una TB activa pasando por un periodo cíclico en donde se presenten TB incipiente y TB subclínica (Drain *et al.*, 2018) (Figura 5).

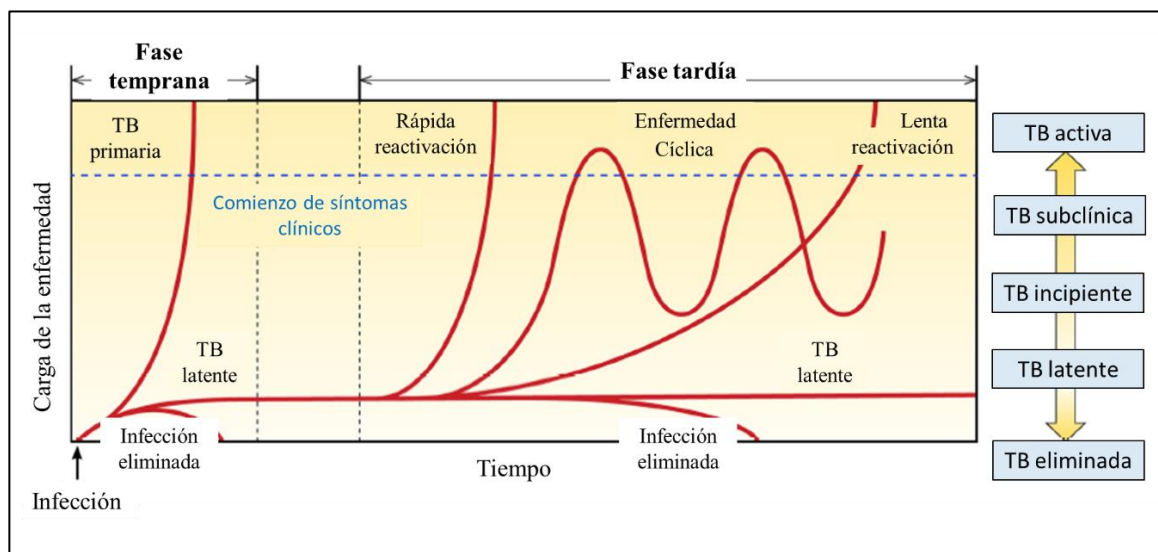


Figura 5. Fases en la progresión de la Tuberculosis. Se muestran las fases de la tuberculosis y los estados clínicos de la misma. Iniciando con una fase temprana en donde se presenta la infección la cual puede desencadenar en una TB primaria, TB latente o en la eliminación de la infección, posteriormente en la fase tardía la tuberculosis latente puede evolucionar a una rápida reactivación, una lenta reactivación, la eliminación de la infección o pasar por estados cíclicos en donde se presenta la TB subclínica y la TB incipiente. Adaptado de Drain *et al.* 2018.

2.2.1 Epidemiología

Actualmente, se ha establecido a la tuberculosis como una de las 10 principales causas de muerte en el mundo, siendo la principal causa de muerte por enfermedad infecciosa. En 2019, se presentaron 7.1 millones de casos reportados, estimándose 10 millones de nuevos casos de TB a nivel mundial provocando 1.4 millones de muertes (OMS, 2020) (Figura 6). Según reportes de la secretaría de salud en el año 2020 se reportaron 31,724 nuevos casos en México. Siendo los tres estados más afectados Guerrero, Hidalgo y el Estado de México con 3,488, 3,167 y 2,686 casos respectivamente (epidemiologica, 2021) (Figura 7).

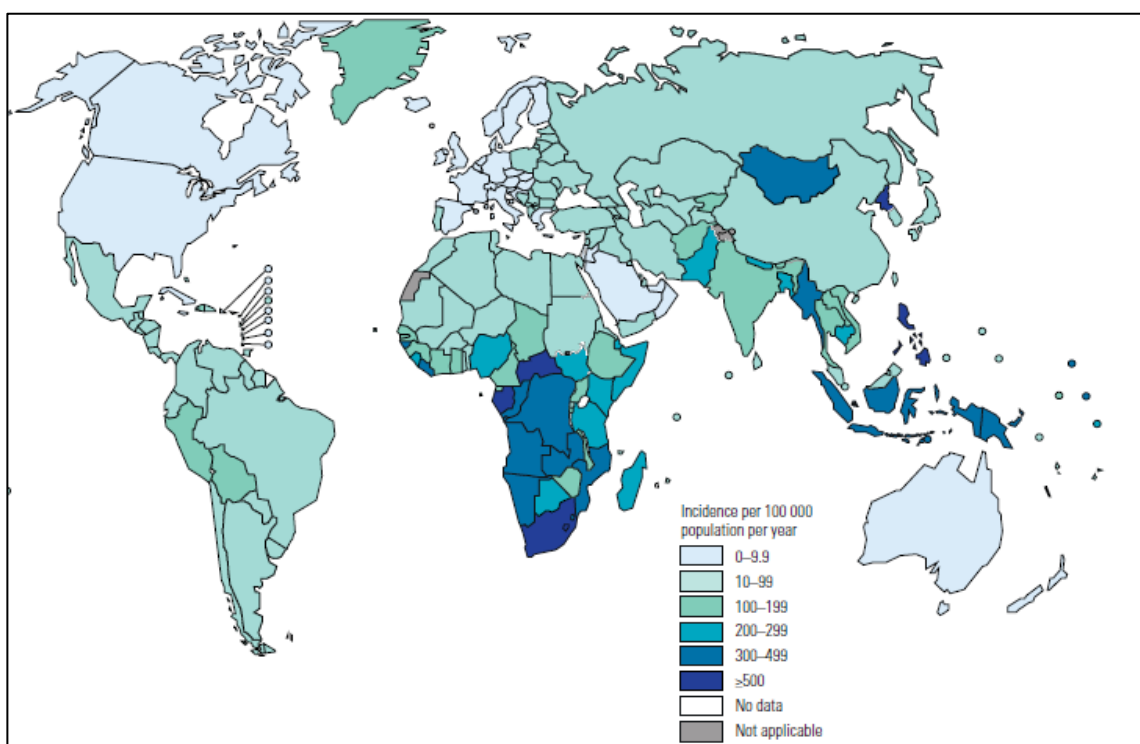


Figura 6. Incidencia Mundial de TB. Incidencia estimada en el año 2019. OMS, 2020.

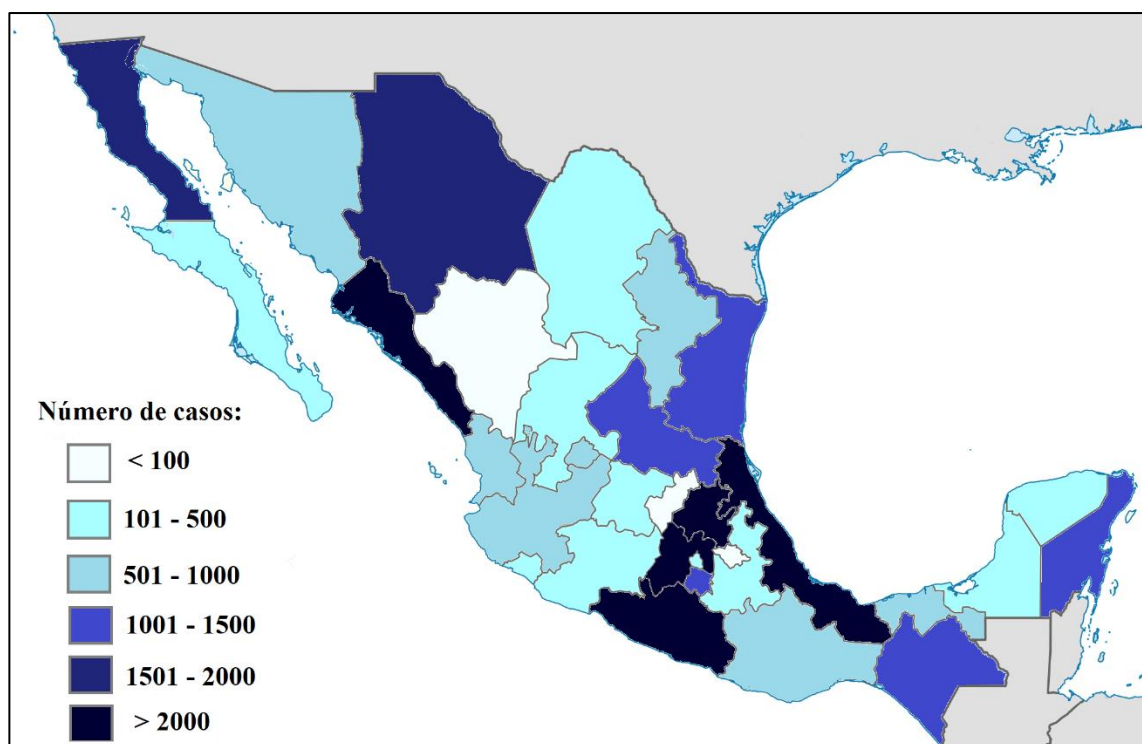


Figura 7. Incidencia de TB en México. Número de casos reportados por estado durante 2020. SSA, 2020.

2.2.2 Tratamiento

El tratamiento de la tuberculosis se dificulta debido a las características de la bacteria *M. tuberculosis* que tiene un tiempo de generación alargado, además de presentar la facultad de entrar en periodos de latencia. De igual manera, esta micobacteria presenta una pared compleja, lo que dirige a una permeabilidad reducida para una gran variedad de compuestos. Se conoce que dentro de un hospedero pueden existir poblaciones de micobacterias diferentes en función de su localización y actividad. Por lo que, los fármacos antituberculosos deben presentar un perfil de actividad diferente frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones bacterianas (Coll, 2003).

El tratamiento de la tuberculosis dirige a la reducción de la transmisión, así como la resolución de la enfermedad. Para que esto ocurra, los fármacos deben ser capaces de reducir la población bacteriana rápidamente, prevenir la selección natural de las cepas y esterilizar la lesión (Rabahi *et al.*, 2017). Durante el tratamiento de la tuberculosis se usan un conjunto de fármacos para los cuales el microorganismo es susceptible, al usarse dos o más fármacos se previene la generación de resistencia por parte del microorganismo.

La tuberculosis es generalmente tratada con 4 fármacos, conocidos como fármacos de primera línea, que son rifampicina (RIF), isoniazida (INH) pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) (Hillemann *et al.*, 2009). El tratamiento de la tuberculosis es eficaz en un 95% de los casos, aunque se observan variaciones en esta efectividad dependiendo de la localización de la enfermedad. En 1960 debido a la resistencia bacteriana se inició la estandarización del tratamiento para la tuberculosis, proponiéndose el uso de estos 4 fármacos. No todas las personas infectadas con *M. tuberculosis* progresarán hacia la enfermedad; Por esto existen dos condiciones: personas con infección latente y personas que presentan la enfermedad (TB activa); en ambas condiciones los pacientes deben recibir un tratamiento adecuado. En personas con infección latente el tratamiento se lleva a cabo con un menor número de fármacos, estos son INH, RIF y rifapentina (CDC, 2021; Rabahi *et al.*, 2017). En personas con tuberculosis activa los fármacos comúnmente usados para su tratamiento son: RIF, INH, PZA y EMB (Coll, 2003; G. W. H. O. OMS, 2020). La OMS recomienda la administración de estos cuatro fármacos durante 2 meses y un posterior periodo de 4 meses usando solamente los fármacos INH y RIF (G. W. H. O. OMS, 2020).

2.2.2.1 Fármacos de primera línea

La INH es el fármaco más comúnmente usado para el tratamiento de la TB. Este fármaco fue primeramente sintetizado a partir de isonicotinato de etilo e hidracina en 1912, pero no fue hasta 1952 que fue propuesto como un fármaco antituberculoso (Sugawara, 2007). La INH entra al bacilo por medio de difusión pasiva, al ser un profármaco necesita ser activado, este proceso es llevado a cabo mediante la enzima catalasa peroxidasa codificada por el gen *katG* (Shehzad *et al.*, 2013). Esta activación produce una amplia gama de especies reactivas de oxígeno y radicales isotónicos, los cuales son capaces de oxidar o acilar los grupos proteicos, provocando daño en el DNA, peroxidación de lípido e interfiriendo en el metabolismo bacteriano (Sugawara, 2007).

La RIF se introdujo en el año 1967 para el tratamiento de la tuberculosis, es un fármaco semisintético que posee un potente efecto inhibidor en la síntesis de RNA mensajero, y por lo tanto, de la transcripción genética, produce el efecto mediante su unión a la subunidad beta de la polimerasa de RNA. Además este fármaco posee una fuerte

acción esterilizante de las bacterias en estado de latencia, tanto en el interior de los macrófagos como en los focos necróticos (Coll, 2003). De igual manera, la RIF induce a la uridina difosfato glucosiltransferasa (UGT) y a la adenosina trifosfato (ATP) uniéndose a la glicoproteína transportadora de ATP (Regazzi *et al.*, 2014).

La PZA es un importante fármaco de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis, tiene una actividad de esterilización notable cuando se administra en conjunto con la RIF. Fue sintetizado por primera vez en 1936 y utilizado como tratamiento para la tuberculosis desde 1952, es derivado sintético de la nicotinamida. La PZA es un profármaco que debe ser convertido a su forma activa el ácido pirazinoico (POA), este compuesto es primeramente formado en el citoplasma como el anión POA el cual no presenta actividad contra las micobacteria, posteriormente es secretado y en condiciones ácidas se convierte en POA protonado el cual entra a la célula y se acumula, provocando la muerte de la bacteria (Sugawara, 2007). Debido a esto, la PZA posee un efecto esterilizante sobre las bacterias en latencia que se encuentran dentro de los macrófagos, permitiendo reducir la duración del tratamiento a 6 meses cuando se usa en asociación con RIF. La PZA no presenta actividad frente a las demás micobacterias (Coll, 2003). Actúa de manera preferencial en ambientes ácidos durante la inflamación activa sobre micobacterias no replicativas con un bajo metabolismo (Shi *et al.*, 2011). Además, este fármaco contribuye a la disminución de las citosinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, provocando la autofagia en las células infectadas (Maeurer y Zumla, 2014). Estudios recientes han reportado que el ácido pirazinoico actúa inhibiendo la transtraducción al unirse a la proteína RpsA; en este proceso celular rescata a los ribosomas que se encuentran atascados durante el proceso de traducción, degradando, tanto el polipéptido incompleto así como su RNA mensajero (mRNA), en este proceso el mRNA atascado es desplazado por un tmRNA el cual codifica para un péptido pequeño que está marcado para iniciar la degradación por proteasas específicas de la proteína estancada, y de esta forma liberando al ribosoma para que continúe disponible para el proceso de traducción (Nguyen, 2016) (Figura 8).

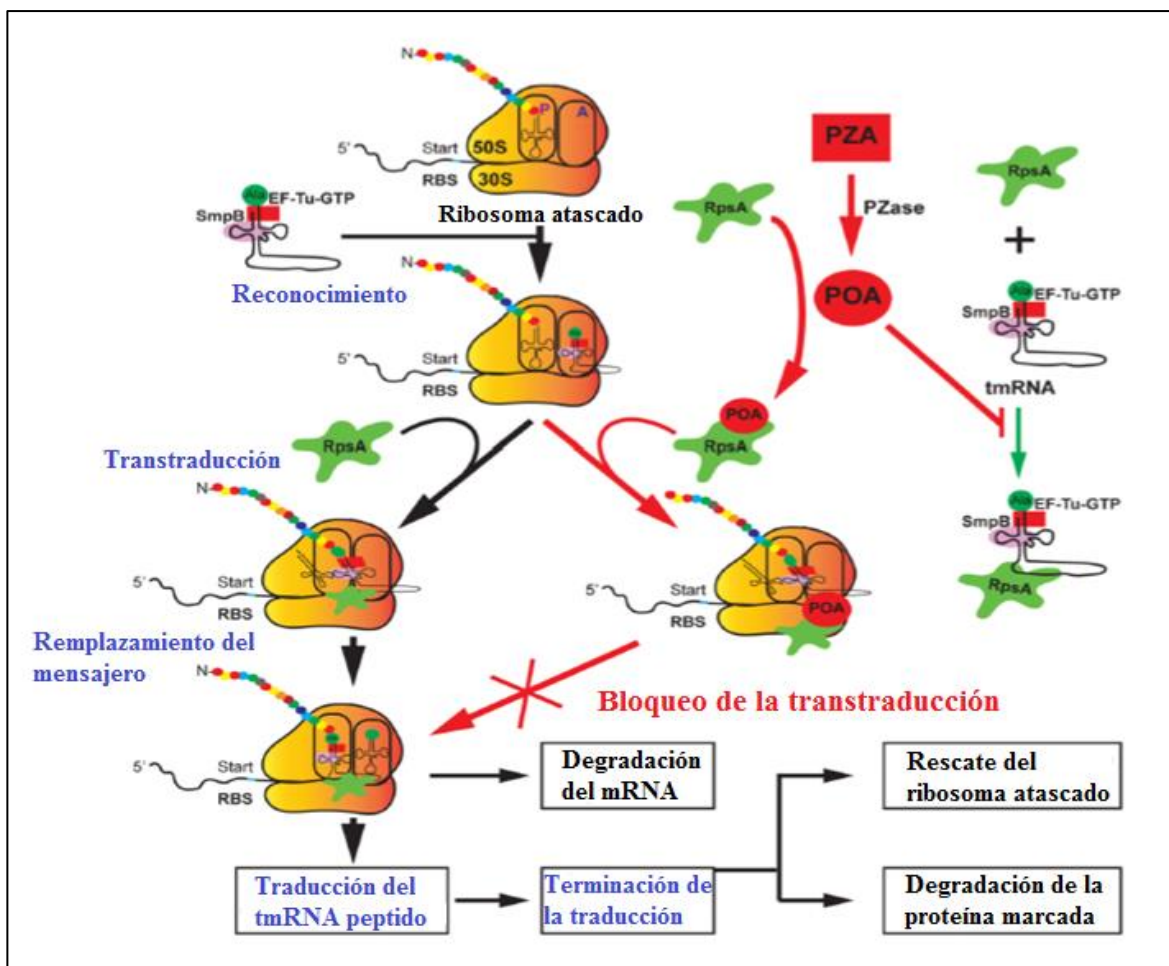


Figura 8. Proceso de transtraducción y mecanismo de acción de PZA. Adaptado de Nguyen 2016.

El EMB (etilen-diamino-dibutanol) es derivado de la etilendiamina, fue introducido en 1961 como un fármaco antituberculoso. El espectro de actividad del fármaco incluye a *M. tuberculosis*, así como, una amplia variedad de las micobacterias de crecimiento lento (Sugawara, 2007) y tiene una menor actividad en las especies de crecimiento rápido. El mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado, estudios recientes proponen que este fármaco inhibe de forma específica a la enzima arabinosil transferasa, efectuando la inhibición de la biosíntesis de la pared micobacteriana (Coll, 2003; Shehzad *et al.*, 2013; Sugawara, 2007). El EMB actúa de manera bacteriostática contra bacilos en crecimiento, pero no presenta un efecto sobre bacilos en estado no replicativo (Shehzad *et al.*, 2013).

2.2.2.2 Fármacos antimicobacterianos de segunda línea

Los fármacos de segunda línea constituyen alternativas terapéuticas para cepas con resistencia farmacológica, sin embargo, estos fármacos son más tóxicos y el tratamiento es más costoso (Becerril-Montes *et al.*, 2013; Coll, 2003). Los fármacos de segunda línea se encuentran clasificados en los grupos 2 al 5, según la clasificación de la OMS (Rendon *et al.*, 2016) (Tabla 1).

Tabla 1. Grupos de fármacos usados para el tratamiento de la tuberculosis

Grupos	Medicamentos
Grupo 1. Agentes orales de primera línea	Isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida
Grupo 2. Flouroquinolonas	Moxifloxacina, altas dosis de levofloxacino
Grupo 3. Nuevos fármacos	Linezolida, delamanida, bedaquilina
Grupo 4. Agentes inyectables	Amikacina, capreomicina, kanamicina
Grupo 5.	Clofazimina, etionamida, carbapenos
Grupo 6.	Cicloserina, ácido paramino-salicílico, amoxicilina

Adaptado de Rendon *et al.*, 2016.

2.2.3 Farmacorresistencia

Cuando se da una mala prescripción o administración, en conjunto con la falta de adherencia del paciente al tratamiento, puede ocurrir resistencia farmacológica en *M. tuberculosis*. Se considera tuberculosis multifármacorresistente (TB-MFR) aquella que es resistente al menos a los dos fármacos de primera línea: INH y RIF. La tuberculosis con resistencia extendida es aquella que es resistente a INH y RIF, además de alguna flouroquinolona y a un fármaco adicional como lo es levofloxacino, moxifloxacina, bedaquilina y linezolida (OMS, 2021).

El tratamiento de TB-MFR con fármacos antimicobacterianos de segunda línea tiene una mayor duración, además son más tóxicos y presentan costos más altos que los antimicobacterianos de primera línea. Se ha identificado que si estos antimicobacterianos

de segunda línea son administrados de manera inapropiada en pacientes con TB-MFR se puede conducir a la aparición de tuberculosis con resistencia extendida (LoBue, 2009; OMS, 2021). La OMS estima que 50 millones de personas alrededor del mundo se encuentran infectadas con una cepa resistente al menos a un antimicobacteriano de primera línea, encontrándose esta resistencia en 45 países (Hillemann *et al.*, 2009; G. W. H. O. OMS, 2020; Zazueta-Beltran *et al.*, 2011).

La TB-MFR es un problema en aumento, en 2019 se diagnosticaron 465,000 nuevos casos (OMS, 2020). Existe un alto rango de mortalidad entre la población no diagnosticada con TB-MFR y pacientes tratados con fármacos de segunda línea debido a la toxicidad de estos (Maeurer y Zumla, 2014) (Figura 9). En 2019 se reportaron 182,000 fallecimientos por causa de estas cepas resistentes (G. W. H. O. OMS, 2020). En un estudio realizado en México, se reportó una incidencia de TB-MFR del 12-33%, y en el año 2013 en Nuevo León se registró una incidencia del 17% en aislados clínicos (Becerril-Montes *et al.*, 2013; Zazueta-Beltran *et al.*, 2011).

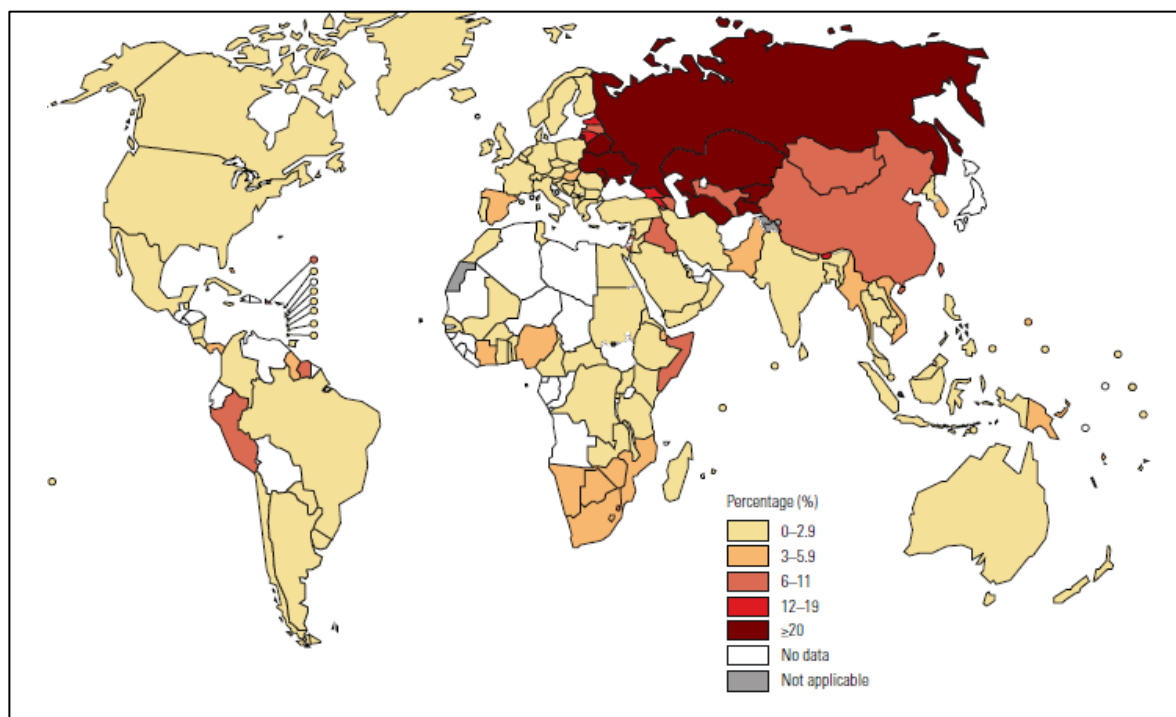


Figura 9. Incidencia mundial de TB-MFR. Incidencia reportada en el año 2019, casos reportados en porcentajes. OMS, 2020.

2.2.3.1 Tipos de farmacoresistencia

2.2.3.1.1 Resistencia adquirida

La resistencia adquirida puede ocurrir en bacterias a través de mutaciones o transferencia horizontal de genes mediadas por fagos, plásmidos o transposones. Sin embargo, la transferencia horizontal de genes no ha sido reportada en *M. tuberculosis*, por lo que la resistencia adquirida se atribuye principalmente a la presencia de mutaciones (Nguyen, 2016). La TB-MFR se asocia principalmente a la acumulación de mutaciones en genes blanco o genes involucrados en el metabolismo del fármaco (Tabla 2) y la probabilidad de mutación es directamente proporcional a la carga bacteriana (Rattan *et al.*, 1998).

Tabla 2. Principales genes involucrados en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. tuberculosis*.

Gen	Proteína codificada	Función de la proteína	Resistencia al fármaco
<i>katG</i>	Catalasa-peroxidasa	Activación del profármaco	Isoniazida
<i>inhA</i>	Enoyl ACP reductasa	Blanco del fármaco	
<i>Ndh</i>	NADH deshidrogenasa II	Modulación del radio NADH/NAD	
<i>ahpC</i>	Alquil hidropoxidasa	Resistencia en estrés oxidativo	
<i>rpoB</i>	Subunidad β de la RNA polimerasa	Blanco del fármaco	Rifampicina
<i>pncA</i>	Piracinamidasa	Activación del profármaco	Pirazinamida
<i>rpsA</i>	Proteína ribosomal S1	Blanco del fármaco	
<i>embCAB</i>	Arabinosiltransferasas	Blanco del fármaco	Etambutol

Adaptado de Nguyen 2016

La resistencia a RIF es principalmente debido a mutaciones en el gen *rpoB*, donde alrededor del 96% de las mutaciones son encontradas en la región de 81pb del conocida como región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR, por sus siglas en inglés) (Shehzad *et al.*, 2013). Dado que el mecanismo de acción de RIF consiste en unirse a la subunidad β de la RNA polimerasa a 12 aminoácidos del sitio activo de la enzima,

provocando una inhibición alostérica; se ha asociado la resistencia con mutaciones en los tripletes que codifican para los aminoácidos con los cuales se une este fármaco, destacando los cambios de aspartato en la posición 516 (D516V), histidina 526 (H526Y) y serina 531 (S531L) cómo los mayormente relacionados con la resistencia a RIF, así como los cambios en aminoácidos glutamato 436, histidina 445 y serina 450 (Koch *et al.*, 2014) (Figura 10).

La resistencia a INH se presenta con mayor frecuencia que la resistencia a otros fármacos antituberculosos. Esta resistencia ocurre mediante una mutación en el gen *inhA*, al reemplazar un aminoácido en el sitio de unión a NADH, previniendo la inhibición de la biosíntesis de los ácidos micólicos, varias mutaciones genéticas han sido observadas entre las regiones 138 y 328, siendo la mutación más común un cambio de serina (S315Y) la cual se ha identificado en un 40% de las cepas resistentes a INH (Shehzad *et al.*, 2013). Además, se ha asociado que aproximadamente 60-70% de cepas resistentes a INH presentan mutaciones en los genes *katG*, *kasA*, *ahpC* y *ndh* (Chaoui *et al.*, 2009).

Múltiples estudios han demostrado que la resistencia a EMB es debida a mutaciones espontáneas que ocurren aproximadamente en 1×10^7 organismos. Comúnmente estas mutaciones conducen a un incremento en la producción de la enzima arabinosil transferasa eliminando los efectos inhibitorios del EMB (Shehzad *et al.*, 2013). Se ha identificado a la mutación en el gen *pncA* que codifica para la enzima bacteriana pirazinamidasa como el principal mecanismo de resistencia a PZA en *M. tuberculosis* (Shi *et al.*, 2011).

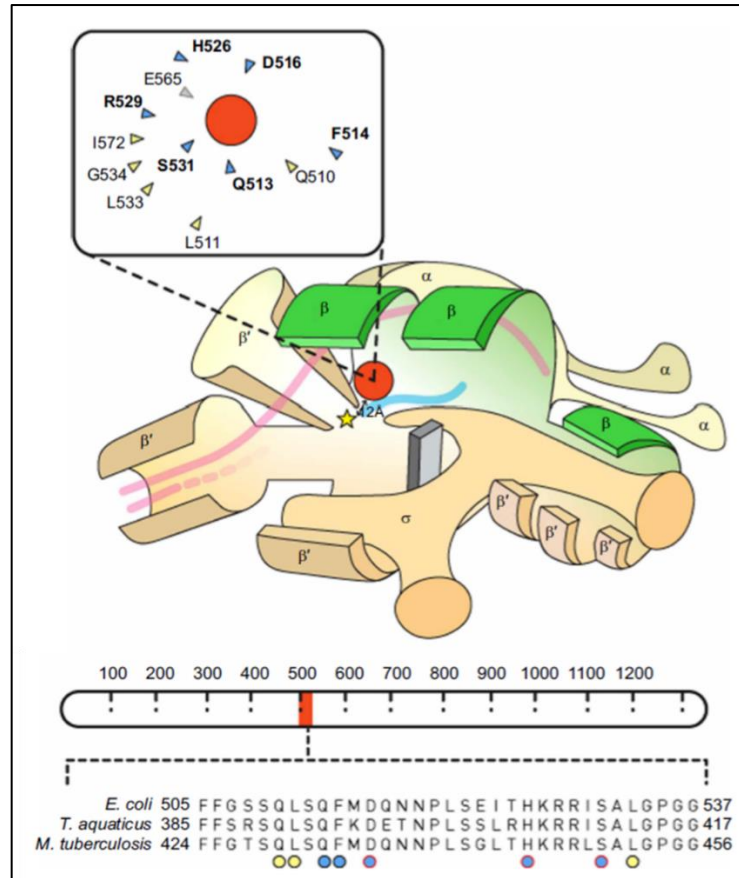


Figura 10. Representación esquemática de los elementos estructurales de la RNA polimerasa incluyendo la región determinante a la resistencia a RIF (RDRR). Se muestra en color verde la subunidad β de la RNA polimerasa, codificada por el gen *rpoB*. Con una estrella amarilla se representa el sitio activo de la enzima y con un círculo rojo la RIF que se une a una distancia de 12 aminoácidos de este sitio inhibiendo la transcripción. La doble cadena de DNA está representada por líneas rosas y la cadena de RNA creciente de color azul. En el recuadro se muestran los aminoácidos que interaccionan con la RIF, marcados de azul aquellos que forman puentes de hidrógeno y los que forman uniones de Van der Waals de color amarillo. Las mutaciones localizadas de los 11 a 12 residuos alrededor del sitio de unión de la rifampicina se han asociado a la resistencia, esta región es conocida como RRDR, se encuentra representada en el recuadro inferior mostrando los números correspondientes para su localización en la RNA polimerasa de *E. coli*, *T. aquaticus* y *M. tuberculosis*. Los aminoácidos que interactúan directamente con la RIF están indicados con círculos y los colores corresponden a lo indicado en el recuadro superior. Los aminoácidos con círculos de contorno rojo son en los que mayormente se observan cambios relacionados con la resistencia a RIF en aislados clínicos (Koch *et al.*, 2014).

2.2.3.1.2 Resistencia intrínseca

Los mecanismos de resistencia intrínseca al contrario de la resistencia adquirida se encuentran de manera natural en la bacteria y proveen a *M. tuberculosis* un alto fondo de resistencia a fármacos, lo cual no solamente limita el uso de antibióticos, sino que también hace más difícil el desarrollo de nuevos antimicobacterianos (Nguyen, 2016).

Los mecanismos de resistencia intrínseca conocidos son mecanismos especializados como la alteración de la molécula blanco, mimetizar la molécula blanco, la modificación directa del fármaco, la degradación del fármaco y las bombas de eflujo. Además, existe otro mecanismo de resistencia intrínseca el cual consiste en la disminución de la permeabilidad de la pared celular (Nguyen, 2016).

2.2.3.1.2.1 Resistencia de la pared celular

La pared de las micobacterias funciona como una barrera para la penetración de antibióticos (como es el caso de las β -lactamasas de la cual su penetración es 100 veces más lenta en *M. tuberculosis* que en *E. coli*) ya que está constituida en un 60% por lípidos y su principal característica es que, además de peptidoglicanos, presenta ácidos micólicos. Los ácidos micólicos son lípidos α -ramificados altamente hidrofóbicos. En 1999 Liu y Nikaido analizaron una mutante de *M. smegmatis* deficiente en la síntesis de ácidos micólicos y encontraron que esta cepa era más sensible a los fármacos eritromicina, cloranfenicol y rifampicina; los autores señalan que este aumento en la sensibilidad puede deberse a la deficiencia en la síntesis de ácidos micólicos lo que ocasionaría un cambio en la pared celular ocasionada posiblemente por una mutación en un gen que codifica para una dehidrasa envuelta en el alargamiento de los ácidos micólicos (Brouns *et al.*, 2008; Liu y Nikaido, 1999; Nguyen y Thompson, 2006; Nikaido, 2001).

2.2.3.1.2.1.1 Composición de la pared celular de *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* presenta una pared celular única, cerca del 60% está constituida por lípidos y además de peptidoglicanos, presenta ácidos micólicos los cuales le brindan esta característica única. Los ácidos micólicos son lípidos que

presentan una alta hidrofobicidad dado que se encuentran α -ramificados, representan el 50% del peso seco de la micobacteria y le brindan a la micobacteria una baja permeabilidad, debido a que forman una pared alrededor del microorganismo. Esta característica contribuye a la virulencia. En estudios previos se ha sugerido que la presencia de los ácidos micólicos evita la acción de lisozima y radicales de oxígeno durante la fagocitosis (Kaufmann, 2001).

El modelo más reciente de la estructura de la pared de las micobacterias la divide en tres secciones: una membrana externa que en el caso de las especies patógenas está formada principalmente de glucano y en las especies no patógenas principalmente de proteínas; además, de una pared celular compuesta por la micomembrana, arabinogalactano y peptidoglucano. La micomembrana tiene un grosor aproximado de 7-8 nm, presenta una organización no convencional, la capa interior está formada por ácidos micólicos unidos a arabinogalactano que a su vez se encuentra unido covalentemente al peptidoglucano y una capa externa formada por lípidos libres. Después se encuentra un espacio periplásmico que separa la pared celular de la membrana plasmática, la cual sería el último componente de esta pared micobacteriana. Esta membrana muestra una composición convencional, formada principalmente de fosfolípidos y proteínas (Figura 11) (Chiaradia *et al.*, 2017).

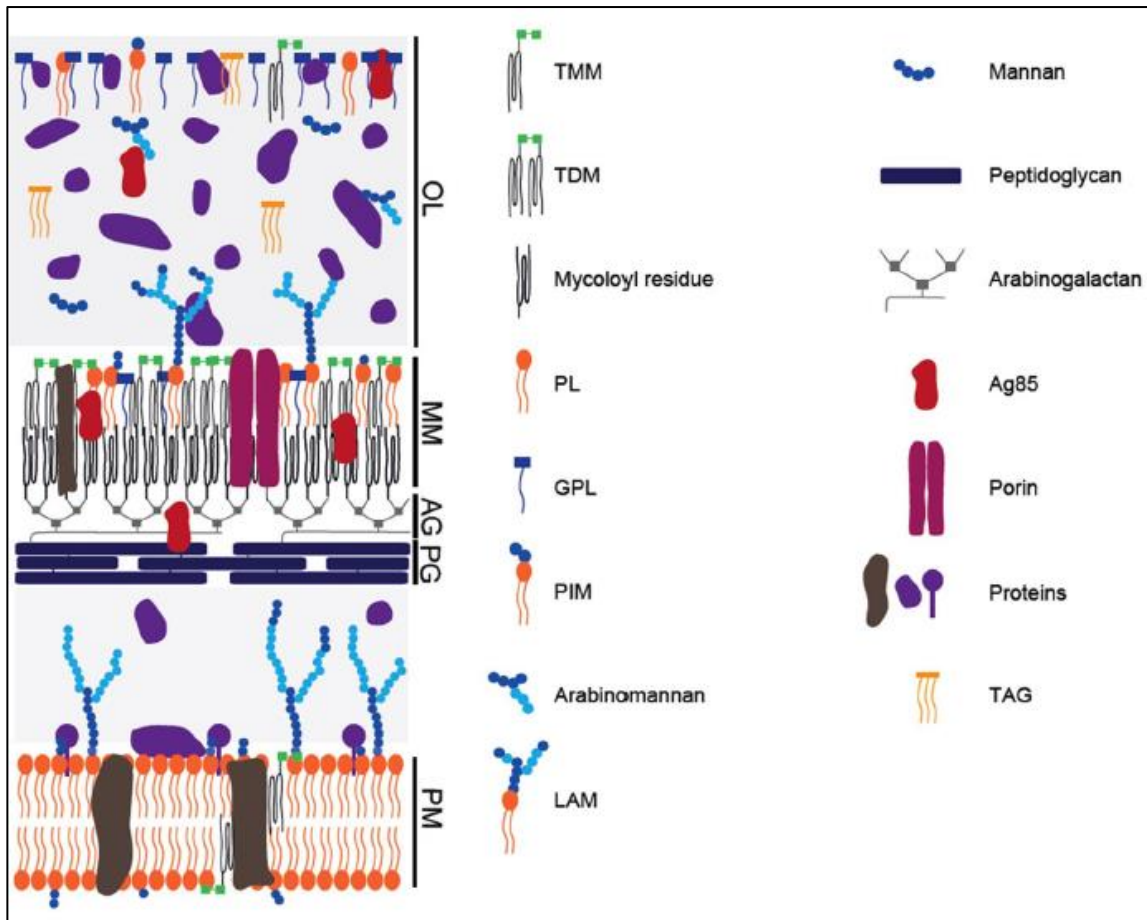


Figura 11. Estructura de la pared micobacteriana. Membrana externa (OL) compuesta principalmente de proteínas, carbohidratos y lípidos libres, micomembrana (MM) compuesta por ácidos micólicos unidos a arabinogalactano (AG) y estos a su vez a peptidoglucano (PG), membrana plasmática (PM) compuesta principalmente por fosfolípidos. TMM (trealosa monomicolatos), TDM (trealosa dimicolatos), PL (fosfolípidos), GPL (glucofosfolípidos), PIM (fosfatidil inositol manosidos), LAM (lipidoarabinomananos), TAG (triacilglicerolos). (Chiaradia *et al.*, 2017).

Además, las micobacterias presentan el péptidoglucolípidio *Wax-D* que es el componente que se encuentra en mayor proporción en el adyuvante completo de Freund (ACF) y la proteína “*Cord Factor*”, la cual es responsable del crecimiento característico de *M. tuberculosis* en forma de serpentina. *M. tuberculosis* también presenta una envoltura que le permite a la bacteria sobrevivir en los fagocitos del hospedero y provee una fuente de antígenos glucolipídicos para células T (Kaufmann, 2001) (Figura 12).

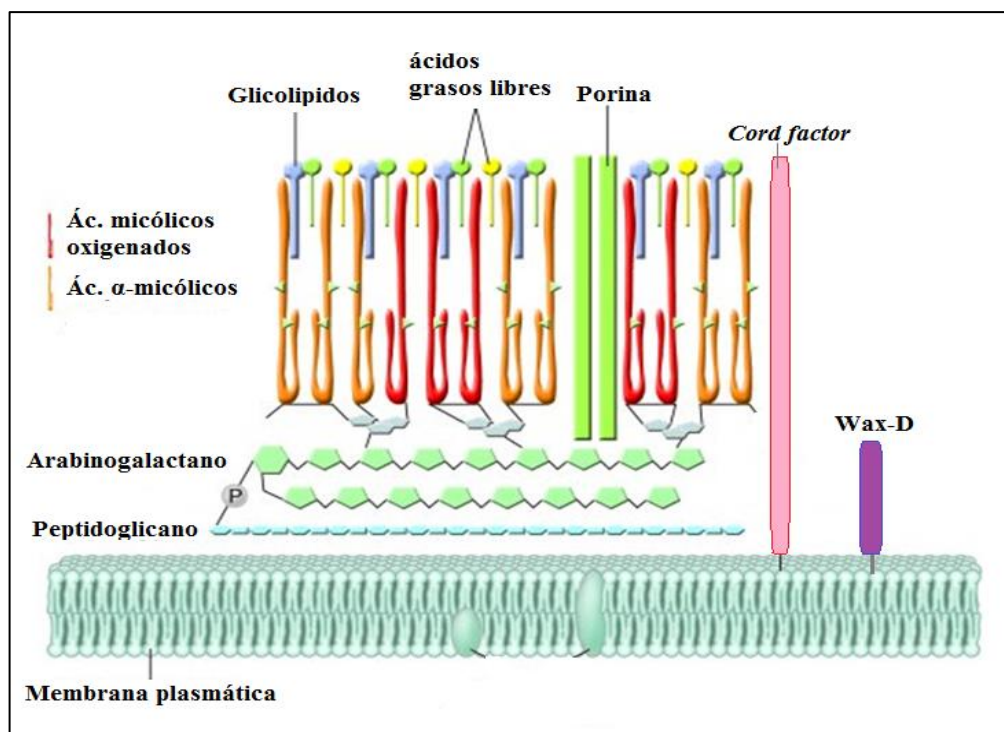


Figura 12. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. Mostrando las dos formas de ácidos micólicos, 1) ácidos α -micólicos (Naranja) que es la forma más abundante, y 2) micolatos oxigenados (Rojo) que se encuentran unidos covalentemente a la capa de arabinogalactano que está unida a su vez al peptidoglicano. Además, se encuentran otros complejos de lípidos como glicolípidos y lípidos libres. La pared celular contiene también la proteína *Cord factor* (Rosa) y Wax-D (Morado). Modificado de (Riley, 2006).

2.2.4 Lipasas de *M. tuberculosis*

Las lipasas han sido bien caracterizadas en el medio animal, principalmente en mamíferos en donde juegan un papel importante en la digestión de grasas, el metabolismo de lipoproteínas, así como la movilización de ácidos grasos almacenados en adipocitos. A pesar de que la actividad lipolítica se ha descrito en micobacterias desde hace muchos años, es reciente el estudio de las enzimas asociadas, lipasas y fosfolipasas. Lipasas y fosfolipasas son moléculas que realizan biocatálisis esencial por la hidrólisis de ésteres conteniendo ácidos grasos de cadenas largas. Un aspecto interesante que recientemente fue dilucidado, es su inmunogenicidad, por la cual ha sido propuesto por su uso como biomarcadores de TB activa (Dedieu *et al.*, 2013).

El análisis del genoma de *M. tuberculosis* ha revelado que esta bacteria posee alrededor de 250 genes que codifican para lipasas potenciales. Esta característica, combinada con la alta cantidad de lípidos de la pared micobacteriana, sugiere que estos lípidos y enzimas lipolíticas juegan un papel importante en el ciclo de vida de las micobacterias y en su virulencia. Análisis *in silico* han identificado la presencia de alrededor de 30 genes que codifican para enzimas lipolíticas potenciales, incluyendo 24 lípidos/éster hidrolasas, pertenecientes a la familia “Lip” que codifican para enzimas nombradas de la C a la Z (LipC a LipZ). Estas proteínas presentan una secuencia consenso: GX SXG, lo cual es una característica de los miembros de la familia α/β hidrolasas (Brust *et al.*, 2011; Dedieu *et al.*, 2013). Estas lipasas se han clasificado a su vez dentro de diferentes familias: la familia de lipasas de *Candida parapsilosis*, la familia de lipasas estimuladas por sales biliares (BSSL), la familia de lipasas humanas sensible a hormonas (HSL), la familia de cutinasas de *Fusarium solani*, la familia de monoacilglicerinas, la familia de fosfolipasas C (PLC) y aquellas no pertenecientes a ninguna de las familias anteriormente mencionadas (Dedieu *et al.*, 2013).

Una de las lipasas más estudiadas es Rv3802, la cual es una de las 7 cutinasas presuntivas codificadas por el genoma de *M. tuberculosis*. En fitopatógenos las cutinasas hidrolizan la capa de cera de las plantas, la cutina. Pero en patógenos de mamíferos, como en el caso de *M. tuberculosis*, es común que estas proteínas tengan una función diferente. Esta enzima Rv3802 fue evaluada *in vitro* donde se encontró que posee actividad de fosfolipasa A y una actividad significativa de Tioesterasa participando en la síntesis de ácidos micólicos (Parker *et al.*, 2009).

2.2.4.1 Lipasas asociadas a farmacorresistencia

En 1999 Liu y Nikaido analizaron una mutante de *Mycobacterium* deficiente en la síntesis de ácidos micólicos y encontraron que esta cepa era más sensible a algunos antimicobacterianos (Nguyen y Thompson, 2006).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se identificó una expresión diferencial de genes en la cepa sensible H37Rv comparándola con el aislado clínico MFR CIBIN:UMF:15:99 de *M. tuberculosis*, esto se efectuó mediante un análisis

global de la expresión de las dos cepas. Se observó que 8 genes mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión: *esxG*, *esxH*, *rpsA*, *esxI*, *rpmI* presentaron un incremento en su expresión en el aislado clínico MFR, mientras que los genes *lipF*, *groES* y *narG* presentaron una disminución en su expresión en este mismo aislado (Peñuelas-Urquides, Gonzalez-Escalante, *et al.*, 2013) (Figura 13). Con la finalidad de identificar si estos genes se encontraban asociados con farmacorresistencia nuestro grupo realizó un análisis de los genes diferencialmente expresados en aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos, así como diferente fondo genético. De igual modo se encontró una relevante diferencia en la expresión de los genes *esxH*, *infA*, *lipF* y *groES* en los aislados clínicos resistentes, concordante con lo observado por Peñuelas-Urquides (2013); además se observó que en aproximadamente el 90% de las cepas analizadas mostraban una disminución en la expresión de *lipF* de las cuales un 75% mostró una disminución mayor al 50% de la expresión de este gen comparado con la cepa pansensible H37Rv (Gonzalez-Escalante *et al.*, 2015)(Figura 14).

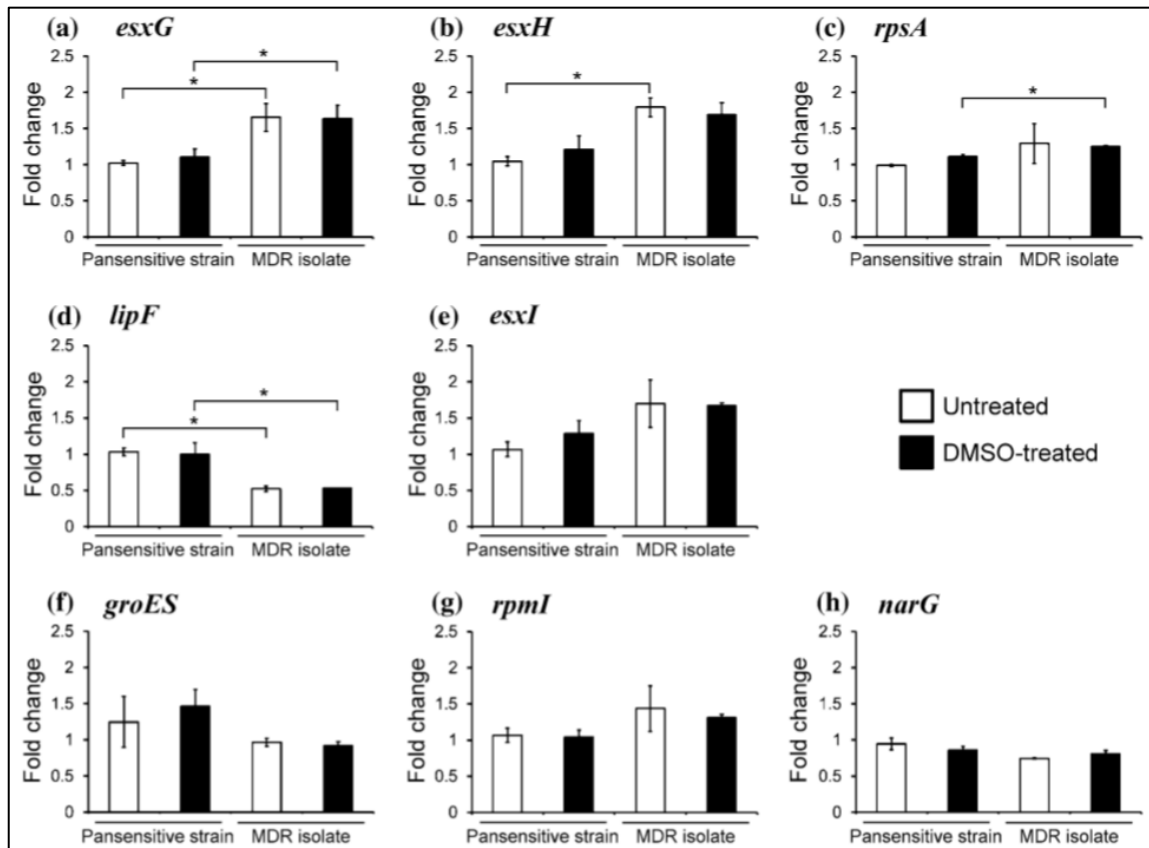


Figura 13. Expresión diferencial de genes en una cepa pansensible H37Rv (pansensitive strain) y un aislado clínico MFR (MDR isolate). Resultados obtenidos mediante RT-qPCR, en los 8 genes mostrados se encontró una expresión diferencial entre las dos cepas. Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013.

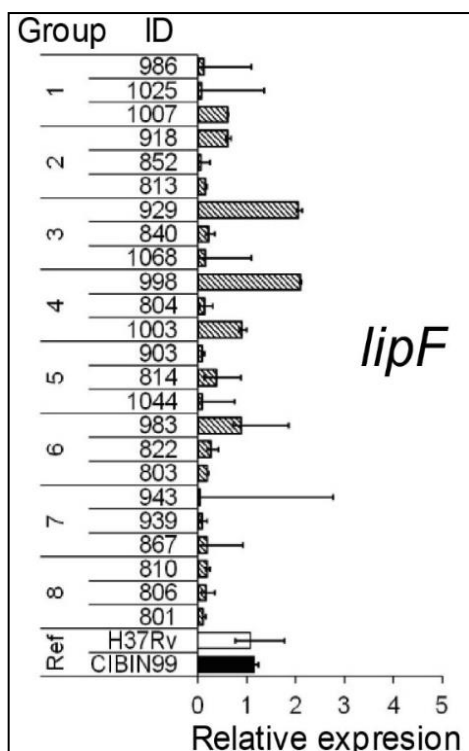


Figura 14. Expresión diferencial del gen *lipF* en aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos. Resultados obtenidos mediante RT-qPCR, de 8 grupos de aislados clínicos con diferente perfil de resistencia a fármacos, donde cada grupo está conformado por 3 cepas con el mismo perfil de farmacorresistencia. Se utilizó como referencia la expresión del gen *lipF* en la cepa pansensible (H37Rv) y en la MFR (CIBIN:UFM:15:99) (Gonzalez-Escalante *et al.*, 2015)

El gen *lipF* (Rv3487c) consta de 834 nucleótidos los cuales codifican para una proteína de 277 aminoácidos (Reddy *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005) esta proteína es una lipasa perteneciente a la familia Lip, tiene función de carboxilesterasa hidrolizando eficientemente cadenas cortas de ésteres y presenta también actividad de fosfolipasa C (Chen *et al.*, 2014; Srinivas *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2005).

Para comprobar si el gen *lipF* estaba involucrado en la farmacorresistencia, éste se expresó en una cepa modelo de *M. tuberculosis* a partir del vector micobacteriano pMV261, observándose que la cepa que expresó LipF fue más sensible a los fármacos RIF y estreptomicina (STR) (Figura 15). Por lo anterior, se concluye que una menor expresión de este gen podría estar relacionado con la resistencia a los fármacos RIF y STR en *M. tuberculosis* (Arriaga-Guerrero *et al.*, 2020).

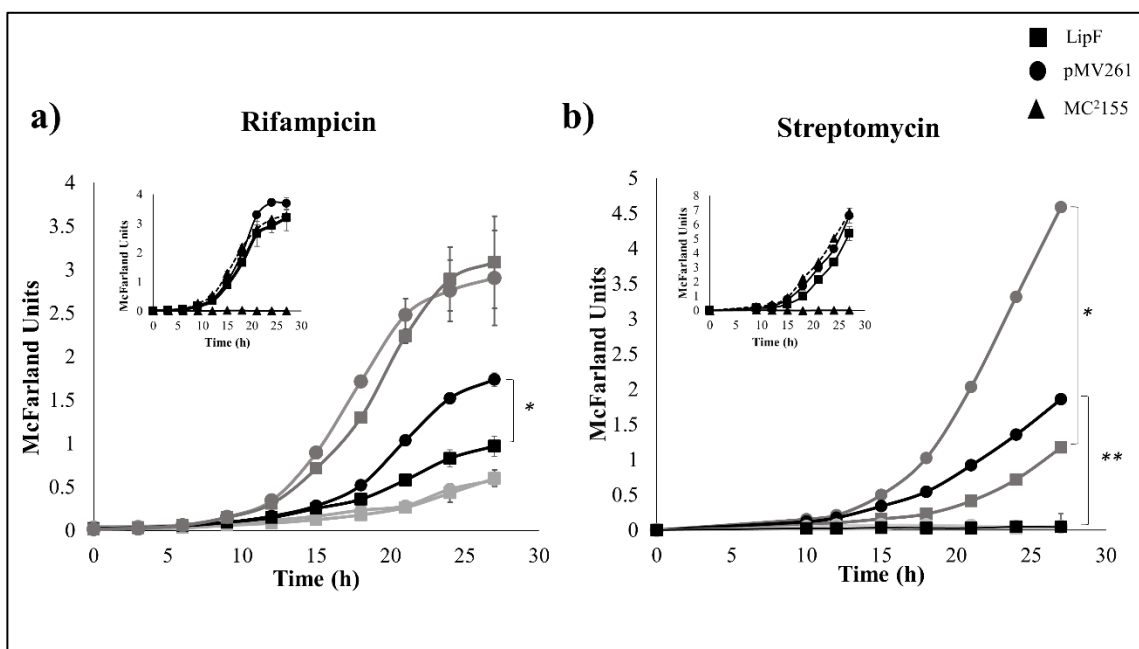


Figura 15. Crecimiento de *M. smegmatis* expresando LipF en presencia de rifampicina (RIF) y estreptomicina (STR). Líneas grises claro representan la curva de crecimiento para la concentración de 3.12 µg/mL de RIF ó 0.25 µg/mL de STR, líneas negras, la curva de crecimiento para la concentración de 1.6 µg/mL de RIF ó 0.12 µg/mL de STR y líneas grises oscuro la curva de crecimiento para la concentración de 0.8 µg/mL de RIF ó 0.06 µg/mL de STR. En la esquina superior izquierda de cada grafica se muestra el crecimiento con medio 7H9 suplementado con 10% de ADC y 20 µg/mL de kanamicina. El ensayo se realizó por duplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Las mediciones se realizaron por nefelometría (unidades McFarland). Marcados con * cuando hay una diferencia significativa $P \leq 0.05$; **, diferencia altamente significativa $P < 0.01$ (Arriaga-Guerrero *et al.*, 2020).

Se ha relacionado a las lipasas LipY, LipC y Rv0183 de *M. tuberculosis* H37Rv con la degradación de lípidos los cuales se plantean provienen de la membrana de las células del hospedero. Estos lípidos son usados por la *Mycobacterium* para la formación de la pared micobacteriana (Brust *et al.*, 2011). De igual forma se han relacionado estas lipasas con la transformación de los macrófagos en macrófagos espumosos en los cuales acumulan lípidos que después son usados como una manera rápida de conseguir energía y material para la síntesis de la pared (Brust *et al.*, 2011; Dedieu *et al.*, 2013).

2.2.5 Modelos experimentales de *Mycobacterium*

Debido al riesgo relativamente alto que representa el manipular cultivos de *M. tuberculosis*, debido a la generación de aerosoles y su potencial virulento y/o farmacorresistente (OMS, 2021), se han establecido cepas utilizadas como modelo para el estudio de este microorganismo. Se han utilizado modelos de *Mycobacterium* como sustitutos para estudios de *M. tuberculosis* (Gonzalez *et al.*, 2012), y una de las cepas más utilizadas como cepa modelo para el estudio de genes de *M. tuberculosis* es la bacteria *M. smegmatis*. Esta micobacteria ha sido ampliamente utilizada como modelo para la expresión de genes nativos de *M. tuberculosis*, así como para evaluar la función de genes ortólogos (Chen *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2005).

2.2.5.1 *Mycobacterium smegmatis*

En el año 1899 se identificó y nombró a la bacteria *Mycobacterium smegmatis* definiéndola dentro del género *Mycobacterium* (Lehmann y Neumann, 1896). Sin embargo, estudios filogenéticos comparativos recientes indican que esta bacteria pertenece a un género diferente por lo que se le nombró como *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) (Gupta *et al.*, 2018). Esta es una bacteria de crecimiento rápido dado que presenta un tiempo de generación de 3 a 4 h si es cultivada en condiciones favorables. Este microorganismo puede ser un patógeno oportunista, no obstante, la manipulación de *M. smegmatis* bajo condiciones controladas en el laboratorio es segura (Gonzalez *et al.*, 2012). *M. smegmatis* ha sido un buen modelo para comprender la fisiología de *M. tuberculosis*. La principal cepa utilizada para este tipo de estudios es *M. smegmatis* mc² 155 (Agrawal *et al.*, 2015; Gonzalez *et al.*, 2012). Se ha identificado que esta cepa presenta una concentración mínima inhibitoria para el fármaco RIF elevada, debido a que posee una enzima que oxida al fármaco, la ADP-ribotransferasa. A pesar de esto, en un estudio realizado por Agrawal *et al.* (2015) se observó que el crecimiento de *M. smegmatis* podía inhibirse a concentraciones mayores de RIF. En este trabajo también se determinaron las CMI de los fármacos INH y EMB. Por lo que se ha propuesto esta bacteria para el estudio de fármacos contra la tuberculosis. Hasta el momento, se han identificado 19 lipasas ortólogas de *M. tuberculosis* en la micobacteria *M. smegmatis* (BioCyc.org, 2021) (Tabla 3).

Tabla 3. Lipasas de *M. tuberculosis* ortólogas en *M. smegmatis*

<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. smegmatis</i>
LipA	LipA
LipB	LipA
LipC	LipC (MSMEG_0289)
LipD	MSMEG_3162
LipE	MSMEG_6575
LipG	LipG (MSMEG_1352)
LipH	LipH (MSMEG_3059)
LipJ	LipJ (MSMEG_4477)
LipN	MSMEG_2409
LipO	LipO (MSMEG_0302)
LipP	LipP
LipR	LipR (MSMEG_3010)
LipU	LipU (MSMEG_5271)
LipV	LipV (MSMEG_1940)
LipZ	LipZ (MSMEG_2777)
Rv0183	MSMEG_0220
Rv1683	MSMEG_3767
Rv1592c	MSMEG_3197
Rv3802c	MSMEI_6226 (MSMEG_6394)

Adaptado de (BioCyc.org, 2021)

Se ha encontrado una identidad del 69% de la proteína LipF de *M. tuberculosis* cuando se compara con el gen que codifica para la esterasa LipU MSMEG_5271 de *M. smegmatis* cepa mc²155 (NCBI, 2015). De igual manera que LipF, LipU presenta actividad de carboxilesterasa con preferencia hacia los sustratos de C4. LipU es estable a bajas temperaturas y se ha encontrado sobreexpresada en estrés nutritivo; además es importante para la sobrevivencia de la micobacteria por lo que ha sido propuesta como un blanco terapéutico (Kaur *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017).

La lipasa LipG se ha identificado como una fosfolipasa A con actividad de tioesterasa y carboxilesterasa con preferencia a C6; se ha identificado que la inhibición de esta lipasa en *M. smegmatis* aumenta la resistencia a los fármacos INH y RIF (Santucci *et al.*, 2018).

Se ha identificado que la lipasa LipH es una carboxilesterasa necesaria para la supervivencia de *Mycobacterium* y un ortólogo de esta en *Corynebacterium* induce cambios en la pared celular modificando la cantidad de ácidos micólicos y glucopeptidolípidos de la pared celular (Canaan *et al.*, 2004; Meniche *et al.*, 2009).

Se conoce que la enzima Rv3802 de *M. tuberculosis* (ortólogo de MSMEI_6226 en *M. smegmatis*) presenta actividad de tioesterasa y fosfolipasa A, siendo una enzima esencial para la viabilidad de *Mycobacterium* (Goins *et al.*, 2018; Parker *et al.*, 2009).

Dhoubi *et al.* realizaron una mutante de *M. smegmatis* para el gen MSMEI-0220 que codifica para un ortólogo de la lipasa Rv0183 de *M. tuberculosis*, pues tienen un 68% de identidad, MSMEI-0220 mostró la misma actividad de monoacilglicerol que tiene Rv0183; de igual forma, estos autores encontraron que al irrumpir la función de esta proteína en *M. smegmatis* era más sensible a RIF y mostraba resistencia al fármaco INH, lo que podría ser debido a un cambio en la composición de la pared de la micobacteria (Dhoubi *et al.*, 2010). Las mutantes reportadas fueron obtenidas mediante recombinación homóloga. El uso de recombinación homóloga para la generación de mutantes en *Mycobacterium* es muy frecuente; sin embargo, se ha reportado una alta frecuencia de recombinación ilegítima (Muttucumaru y Parish, 2004), por lo que se necesitan métodos más efectivos para irrumpir a los genes en *Mycobacterium*.

Recientemente se ha descrito el método de CRISPR-Cas9 como una herramienta simple y que se adapta a un alto rango de especies. Mediante esta herramienta es posible modificar el DNA genómico *in vivo* de una manera directa y altamente eficiente (Liang *et al.*, 2015). Esta técnica fue descubierta en procariotas donde funciona como un mecanismo de inmunidad (Brouns *et al.*, 2008). Este sistema está compuesto principalmente por dos componentes una nucleasa Cas9 (Proveniente de *Streptococcus pyogenes*) y un RNA guía (RNAg) que funciona para guiar a la proteína Cas9 hacia una región específica, la cual es cortada. Esta técnica es altamente específica, ya que se irrumpirá al gen donde se una el RNAg, que es diseñado de forma complementaria a la región del genoma que se desea eliminar (H. Wang *et al.*, 2016).

Esta técnica de CRISPR-Cas9 se ha implementado en micobacterias en donde se ha logrado reprimir eficientemente la expresión de genes blanco. En este sistema se optimizó el uso de codones de la proteína Cas9 para su empleo en *Mycobacterium* dentro de un plásmido lanzadera (*Shuttle plasmid*), el cual contiene además un promotor

inducible por tetraciclinas. Con este sistema fue posible reprimir diversos genes tanto en *M. smegmatis* como *M. tuberculosis*, lo que permite analizar de manera rápida genes esenciales en micobacterias (Choudhary *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, en el presente proyecto nos proponemos a evaluar la participación de las lipasas LipG, LipU, LipH y MSMEI_6226 mediante la sobreexpresión usando un vector micobacteriano con un promotor constitutivo, y la inhibición mediante la técnica de CRISPR-Cas9, con la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis*.

3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública que ha ido en aumento gracias a la aparición de cepas farmacorresistentes. Esta resistencia comúnmente ha sido asociada a mutaciones, pero, en algunos casos esto no es suficiente para explicar este fenómeno. Existen otros mecanismos de resistencia como lo es la resistencia intrínseca de la pared micobacteriana que funciona como una capa semipermeable para la entrada de fármacos. Esta pared está formada principalmente por lípidos y las enzimas encargadas de su síntesis/degradación son las lipasas. Existen pocos estudios en donde se relacione a las lipasas con el fenómeno de farmacorresistencia. En nuestro grupo de trabajo hemos identificado una lipasa conocida como LipF y demostramos que tiene un efecto en la farmacorresistencia. Por anterior, consideramos de gran importancia evaluar la función de las lipasas en un modelo experimental de *M. tuberculosis* para identificar si estas lipasas también están involucradas en la farmacorresistencia de *Mycobacterium*.

4. HIPÓTESIS

Las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 de *Mycobacterium* participan en el fenómeno de farmacorresistencia.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo General

Estudiar la participación de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en el fenómeno farmacorresistencia en un modelo experimental de *M. tuberculosis*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Inhibir la expresión de lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en *M. smegmatis* mediante CRISPRi.
2. Sobreexpresar las lipasas usando un vector micobacteriano en *M. smegmatis*
3. Evaluar el efecto de la sobreexpresión e inhibición de lipasas en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo y Mantenimiento de *M. smegmatis*

La cepa mc²155 de *M. smegmatis* (ATCC 700084) se cultivó en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10 % de albumina bovina, dextrosa, catalasa (ADC) y 0.05% de Tween 80. La cepa se incubó a 37°C con agitación constante y después se sembró un inóculo en medio Middlebrook 7H9 (suplementado con 10% ADC y 0.05% Tween 80) y en medio sólido Middlebrook 7H10 (suplementado con 10% de OADC (Ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa)). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h, posteriormente 100 µL de los cultivos fueron inoculados en medio líquido; cuando este cultivo llegó a la fase exponencial de crecimiento (20 h después de la inoculación), 1 mL de cultivo fue centrifugado a 4,300 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de medio de preservación (medio Middlebrook 7H9 adicionado con 10% ADC y 45% glicerol) y se distribuyó en alícuotas de 100 µL las cuales fueron almacenadas hasta a -80 °C hasta su uso.

6.2 Extracción de DNA genómico de *M. smegmatis*

El cultivo de *M. smegmatis* mc²155 se activó inoculando 100 µL en 3 mL de medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de ADC y 0.05 % de tween 80. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante (300 rpm) por 24 h y se realizó una resiembra, inoculando 100 µL del crecimiento en 3mL del medio de cultivo (Medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de ADC y 0.05 % de tween 80) manteniéndose por 24 h bajo las mismas condiciones de temperatura de incubación y agitación. La extracción de DNA genómico de *M. smegmatis* se realizó usando el kit comercial Master pure DNA purification Kit (Lucigen, Wisconsin, USA) usando las indicaciones del proveedor. Brevemente, se centrifugaron 2mL del cultivo con una turbidez mayor a 3 unidades McF a 13000 rpm a 4 °C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y a la pastilla bacteriana se agregaron 500 µL de solución de lisis AL más 2 µL de proteinasa K. La pastilla se disolvió usando vortex y se incubó a 65 °C durante 15 min seguido de una incubación a 80 °C durante una hora; la muestra se colocó en hielo durante 5 min y se le añadieron 250

μL de buffer MPC, la muestra se mezcló usando vortex y se centrifugó a 11,000 rpm a 4 °C durante 10 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se le añadió 750 μL de isopropanol. La muestra se mezcló por inversión y se centrifugó a 11,000 rpm a 4 °C durante 10 min. Finalmente se realizaron dos lavados con etanol al 75 %, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 35 μL de buffer TE 1X con 1 μL de RNasa A.

6.3 Sobreexpresión de Lipasas en *M. smegmatis*

La sobreexpresión de las lipasas (LipG, LipH, LipU, MSMEI_6226) se realizó usando la construcción de pMV261 con la región codificante de cada una de ellas, este vector contiene el promotor de Hsp60 el cual permite realizar la expresión constitutiva de los genes de interés (Stover *et al.*, 1991).

6.3.1 Amplificación de la región codificante de las lipasas

Primeramente, se diseñaron los primers para la amplificación de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226. A cada primer se le agregaron las bases nucleotídicas correspondiente a las secuencias de corte para las enzimas *Bam*HI o *Eco*RI (Tabla 4). Las condiciones de amplificación para cada gen se ajustaron a diferentes temperaturas de fusión y se utilizó Taq DNA polymerase buffer 1×, dNTPs 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM y una unidad de Taq DNA polimerasa (Tabla 5). La amplificación fue verificada mediante separación electroforética en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red Nucleic Acid (Biotium, California, USA) y fotodocumentadas utilizando el equipo Multidoc-it digital imaging system (UVP, California, USA).

Tabla 4. Primers usados para la amplificación de la región codificante de las lipasas

Nombre	Sitio de enzima	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño del amplificado
LipG-F	GGATCC*	ATGCAGACCCGCACCGGGC	64.4	918 pb
LipG-R		TCAACCCACCACGGCAAAGTTT		
LipH-F	GAATTC ⁺	ATGTTGCCGGATCCGATGATC	62.2	1143 pb
LipH-R		TCACCAGCAGTTGGCCAGGG		
LipU-F	GAATTC ⁺	ATGCATCGCCGCCGCAGCG	64.0	957 pb
LipU-R		TCAGGAGACGTTCCGCCAGCC		
MSMEI6226-F	GGATCC*	ATGGCAAAGAACGCTCGGCGT	64.0	1014 pb
MSMEI6226-R		TCAACCGTGTTTCGGATGGGG		

*Sitio de la enzima *Bam*HI, +Sitio de la enzima *Eco*RI

Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación de la región codificante de las lipasas

Lipasa	Temperatura de alineamiento	Condiciones de PCR
LipG	64.4 °C	• 1 ciclo de: 95 °C durante 5 min
LipH	62.2 °C	• 35 ciclos de: 94 °C durante 1 min, la temperatura de
LipU	64 °C	alineamiento durante 1 min y 72 °C durante 1 min
MSMEI_6226	64 °C	• 1 ciclo de: 72 °C durante 5 min

6.3.2 Clonación de la región codificantes de las lipasas en el vector pEXP5-CT/TOPO

Las secuencias amplificadas fueron insertadas en el vector pEXP5-CT/TOPO (Invitrogen, California, USA) usando las condiciones indicadas por el proveedor.

Brevemente, para la ligación se añadieron 1 μ L de producto de PCR, 1 μ L de salt solution, 1 μ L de vector (pEXP5-CT/TOPO) y 3 μ L de agua libre de nucleasas, los reactivos fueron mezclados y después incubados a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, 2 μ L de la reacción de ligación fueron añadidos a 100 μ L de *E. coli* DH5 α competentes, se incubaron en hielo durante 15 minutos y se llevó a cabo el choque térmico a 42 °C durante 30s. La muestra se incubó en hielo durante 2 min y se añadió 1 mL de medio LB; estas bacterias fueron incubadas a 37 °C durante una hora con agitación constante (300 rpm), y transcurrido este tiempo 100 μ L fueron sembrados en agar LB conteniendo 50 μ g/mL de ampicilina y, finalmente, las bacterias fueron incubadas a 37 °C durante 24 h o hasta observar la presencia de colonias aisladas. Los candidatos obtenidos fueron analizados mediante PCR punto final usando DNA plasmídico obtenido por minipreparación, y usando las condiciones para la amplificación de las lipasas antes descritas. Además, se realizó una secuenciación automatizada para verificar la fidelidad de la secuencia codificante de las lipasas. La secuenciación se realizó usando como template al DNA plasmídico purificado de las construcciones de interés y los primers T7 forward y reverse incluidos en el kit. Los resultados obtenidos fueron analizados usando un alineamiento BLAST con la base de datos del NCBI, y los programas CLC sequence viewer 7 y SeqScape V2.7 utilizando las secuencias de referencia de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 de *M. smegmatis* ubicadas en GenBank (NCBI) (*lipG*: ID:4534086, *lipH*: ID: 4534350, *lipU*: ID: 4534118, MSMEI_6226: ID: 4532687).

6.3.3 Subclonación de las regiones codificantes en el vector pMV261

Se realizó una subclonación los fragmentos correspondientes a las lipasas en el vector pMV261. Brevemente, el vector se linearizó utilizando la enzima de restricción *Bam*HI o *Eco*RI, dependiendo del gen a insertarse. La región codificante de las lipasas fue liberada del vector pEXP5-CT/TOPO con estas mismas enzimas. Se realizó una separación de los productos digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa a partir del cual se purificaron tanto el vector linearizado y desfosforilado, como las regiones codificantes de las lipasas usando el kit GENE CLEAN turbo (MP Biomedicals, Ohio, USA). Brevemente, la sección del gel de agarosa conteniendo el fragmento amplificado

correspondiente a la secuencia de cada una de las lipasas, se cortó y se colocó en un microtubo de 1.5 mL y por cada 0.1 g de gel de agarosa contenido en el microtubo, se agregaron 200 µL de solución salina, y se incubó a 55 °C por 5 min. La solución se transfirió a la columna provista en el kit y se centrifugó a velocidad máxima por 15 s; se agregaron 500 µL de solución de lavado a la muestra y ésta se centrifugó a velocidad máxima por 15 s; posteriormente se agregaron 30 µL de la solución de elución sobre la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Una vez concluido este tiempo, la columna se centrifugó a velocidad máxima por 1 min para eluir el purificado en un nuevo microtubo. El vector pMV261 y las regiones codificantes de las lipasas (LipG, LipH, LipU y MSMEI6226) purificados se sometieron a una reacción de ligación usando una unidad de ligasa T4 utilizando la relación 1:3 (vector:inserto). La reacción se incubó 3 h a temperatura ambiente seguida de una posterior incubación a 4 °C toda la noche. Después de la incubación realizó la transformación en la cepa de *E. coli* DH5α y se seleccionaron candidatos que contenían el vector con el inserto en dirección sentido (pMV261:Lipasas).

6.3.3.1 Transformación de la cepa *E. coli* DH5α

La transformación de *E. coli* DH5α se realizó mediante choque térmico. Brevemente las bacterias *E. coli* DH5α fueron habilitadas para su competencia con soluciones conteniendo cloruro de rubidio y almacenadas a – 80 °C hasta su uso. Cien microlitros de bacterias competentes fueron descongelados en hielo, y se añadieron de 1 a 10 µL del plásmido purificado (dependiendo de la relación vector:inserto) y se incubó en hielo durante 1 h; el choque térmico se realizó exponiendo las bacterias a 45 °C durante 90 s, transcurrido este tiempo las bacterias fueron incubadas nuevamente en hielo durante 2 min, se les añadió 1 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 h para permitir la expresión del gen de selección. Finalmente 100 µL del cultivo fue inoculado en agar LB conteniendo el fármaco de selección (Ampicilina 50 µg/mL o Kanamicina 75 µg/mL). Las bacterias fueron incubadas a 37 °C durante 24 h hasta observar la presencia de colonias, las cuales fueron aisladas para su posterior caracterización.

6.3.3.2 Caracterización de las construcciones plasmídicas

La caracterización de las construcciones se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Primeramente, se realizó una extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina utilizando una minipreparación como se menciona en la siguiente sección. La identificación de la orientación del inserto se realizó mediante PCR y secuenciación. Para la PCR se utilizaron combinaciones de los primers pMV261 (Figura 26A) y los de las lipasas (LipG, LipH, LipU, MSMEI_6226) forward y reverse (Tabla 4) y las condiciones finales después de la estandarización fueron las siguientes: buffer Taq 1×, dNTPs 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM y 1U de Taq DNA polimerasa. El programa utilizado para la amplificación consistió en un paso de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, de alineamiento a 61 °C por 30 s, y de extensión a 72 °C por 30 s, y un paso final de extensión a 72 °C por 7 min. Se obtuvieron productos de amplificación de 1,380 pb para LipG, 1,600 pb para LipH, 1,420 pb para LipU y 1,480 pb para MSMEI_6226 cuando el inserto se encontraba en la dirección sentido. Los productos de amplificación fueron separados y visualizados usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red Nucleic Acid (y fotodocumentadas utilizando el equipo Multidoc-it digital imaging system).

6.4 Extracción de DNA plasmídico por Minipreparación de lisis alcalina

Brevemente, cultivos de 3 mL de los candidatos seleccionados fueron crecidos por 24 h a 37 °C con agitación constante en medio Luria Bertani (LB), y después el volumen total se centrifugó para obtener una pastilla de células. La pastilla se lavó con STE y se resuspendió en buffer de lisis alcalina I, secuencialmente se agregó solución de lisis alcalina II y solución de lisis alcalina III mezclando por inversión. La muestra se incubó en hielo de 3 a 5 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se recuperó y se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló en vortex. La muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante dos min y se tomó la fase acuosa, el DNA se precipitó usando 2 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugó para obtener la pastilla y se realizó un lavado con etanol al 70 %. Finalmente, la pastilla conteniendo el DNA plasmídico extraído se resuspendió en 30 µL de TE 1×. El DNA obtenido se cuantificó

usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red Nucleic Acid y se fotodocumentó usando el equipo Multidoc-it digital imaging system.

6.5 Sobreexpresión de lipasas en *M. smegmatis*

Una vez caracterizadas las construcciones, los plásmidos fueron purificados mediante el kit QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), como se menciona en la siguiente sección. Estos plásmidos purificados fueron utilizados para la transformación de *M. smegmatis*, la cual se realizó mediante electroporación, por este motivo, los cultivos micobacterianos fueron crecidos en medio Middlebrook 7H9 adicionado con 10 % de ADC y 0.05 % de Tween 80 hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. 50mL de cultivo fueron centrifugados y resuspendidos en agua libre de nucleasas conteniendo 10 % de glicerol y se sometieron a electroporación en presencia de los plásmidos recombinantes (a una concentración de 200 ng), mediante un pulso de 2.5 kV, 1000 Ohms, 25 μ FD. Posteriormente, las micobacterias se resuspendieron en medio Middlebrook 7H9 más 10 % ADC y se incubaron a 37 °C por 2 h; el cultivo se sembró en medio Middlebrook 7H10 adicionado con 10 % de OADC conteniendo el fármaco de selección kanamicina a 20 μ g/mL y se incubó a 37°C durante 3 días o hasta observar las colonias con morfología característica con bordes irregulares, elevadas, color blanco o crema, con aspecto rugoso. La sobreexpresión de las lipasas se confirmó mediante PCR en tiempo real.

6.6 Purificación del DNA de las construcciones plasmídicas

Una vez identificados los candidatos, las bacterias transformadas se crecieron en un volumen de 3 mL de caldo LB conteniendo 75 μ g/mL de kanamicina y el DNA plasmídico se purificó utilizando el kit QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), utilizando las condiciones indicadas por el proveedor. Brevemente, el cultivo incubado a 37 °C con agitación constante por 24 h, se centrifugó a 13,000 rpm durante 4 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 250 μ L de buffer P1. La mezcla se resuspendió en vortex y se añadieron 250 μ L de buffer P2, se mezcló por

inversión y se añadieron 350 μ L de buffer N3, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a la columna incluida en el kit, se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto, se lavó la columna con 500 μ L de buffer PB, seguido de una centrifugación a 13,000 rpm por un minuto. A la muestra se le realizó otro lavado con 750 μ L de buffer PE, se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto y la muestra fue eluída usando 50 μ L de buffer EB, incubando por un minuto y centrifugando a 13,000 rpm durante un minuto para obtener el eluyente en un tubo estéril. Los plásmidos purificados se cuantificaron por espectrofotometría y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con Gel Red Nucleic Acid.

6.7 Extracción de RNA de *M. smegmatis*

Los cultivos micobacterianos de 10 mL se crecieron hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (2.7 McF), posteriormente el cultivo se centrifugó, y el medio de cultivo se desechó para obtener el RNA total a partir de la pastilla celular de acuerdo con las instrucciones provistas en el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La pastilla micobacteriana se resuspendió en 800 μ L del reactivo TRIzol, se dejó incubar durante 20 min, realizando una resuspensión después de los primeros 10 min de incubación. Posteriormente, esta mezcla fue transferida a tubos FastPrep conteniendo matrix B y se llevó a cabo la lisis mecánica usando el equipo FastPrep 24 (MP Biomedicals, Ohio, USA) durante tres ciclos a una velocidad de 6 m/s, durante 60 s, con un tiempo intermedio de 5 min entre ciclos durante el cual la muestra permaneció en hielo. El lisado fue centrifugado a 12,000 rpm durante 3 min a 4 °C, el sobrenadante fue colectado y se adicionaron 200 μ L cloroformo y la muestra se mezcló por inversión. A continuación, la muestra se incubó durante 3 min a temperatura ambiente, después se centrifugó, transfiriendo el sobrenadante para la posterior precipitación del RNA utilizando isopropanol; posteriormente se realizó un lavado con etanol al 70 %. La cuantificación y pureza del RNA total aislado se determinó por espectrofotometría con luz UV y la integridad se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñidos Gel Red Nucleic Acid. El RNA total se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

6.8 Evaluación de la sobreexpresión e inhibición de las lipasas

Para la evaluación de la inhibición del gen de la lipasa LipH así como la sobreexpresión de los genes de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226, se realizó, primeramente, la extracción de RNA total como se menciona en la sección anterior. Después, el RNA extraído fue tratado con *DNasa I* para eliminar los restos de DNA que pudiese contener la muestra. Finalmente, los niveles de expresión de estos genes se cuantificaron usando RT-qPCR. Estas técnicas se muestran detalladas en las siguientes secciones.

6.8.1 Tratamiento de RNA total con *DNasa I*

Para eliminar la posible contaminación con DNA, el RNA total se trató con *DNasa I* (New England Biolabs, Massachusetts, USA), para esto, 1,000 ng de RNA fueron tratados siguiendo las indicaciones del proveedor. Se utilizó buffer *DNasa I* 1x, enzima *DNasa I* 1U, en un volumen final de 10 µL. La muestra se incubó a 37 °C durante 10 min y la reacción se inactivó usando EDTA 5 mM, y se incubó a 75 °C durante 10 min. La eliminación del DNA se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6.8.2 Retrotranscripción

Se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando 400 ng de RNA total tratado con *DNasaI*. Se siguieron las instrucciones del proveedor utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y hexámeros aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA). Se evaluó la funcionalidad del cDNA mediante PCR punto final para el gen constitutivo *sigA* para lo cual se diseñaron los siguientes primers: *sigA_Int_forward*: 5'-ACGCAAAGACGCCGAGCTGA-3', *sigA_Int_reverse*: 5'-GCTCTTCGGGCGTGGGCTC-3', y las siguientes condiciones para la mezcla de amplificación: buffer Taq 1x, dNTPs 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA). El programa utilizado para la amplificación consistió en un paso de desnaturalización 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, de alineamiento a 59 °C por 1 min, y de extensión a 72 °C por 1 minuto, y un paso final de extensión a 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación fueron separados y visualizados usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con Gel

Red Nucleic Acid y fotodocumentadas utilizando el equipo Multidoc-it digital imaging system.

6.8.3 Rango dinámico de amplificación

Los ensayos de PCR cuantitativa se llevaron a cabo utilizando el equipo 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para la reacción de PCR se utilizaron Master mix TaqMan® 1× (Applied Biosystems) más 400 mM de sondas TaqMan® y 3 µL de cDNA como templado, en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó en el modo estándar utilizando las siguientes condiciones: una incubación inicial a 50 °C por 2 min, seguido por 95 °C por 10 min; posteriormente 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Se estableció una curva de rango dinámico para cada gen (*lipG*, *lipH*, *lipU*, MSMEI_6226 y *sigA*), en la cual se realizaron diluciones seriales de cDNA a partir de 1:8 hasta 1:512; se incluyeron además triplicados técnicos y controles negativos en todos los ensayos. Los resultados fueron analizados mediante una regresión lineal graficando el CT obtenido con el logaritmo de la concentración de RNA, considerando como valores aceptables una pendiente de 3.3 ± 0.3 , $R^2: \geq 0.95$, y la desviación estándar de los triplicados menor a 0.3.

6.8.4 Cuantificación relativa de la expresión de las lipasas

La expresión se evaluó mediante qPCR usando sondas TaqMan (Applied Biosystems, California, USA) diseñadas específicamente para la evaluación de la amplificación de cada una de las lipasas. Estas sondas fueron usadas en la reacción de amplificación a una concentración final de 1x además de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) y se utilizaron las diluciones del cDNA 1:32 y las condiciones estándar de amplificación. Como control endógeno se utilizó el gen *sigA*. El análisis de expresión relativa se realizó usando la fórmula de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

6.9 Evaluación del crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* sobreexpresando lipasas en la condición de resistencia a fármacos

La evaluación de las transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la condición de resistencia a fármacos en *Mycobacterium* se realizó

mediante el método de microdilución en placa con el compuesto resazurina (Agrawal *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2003), por cinéticas de crecimiento y por unidades formadoras decolonias, usando como control la cepa tipo silvestre de *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084).

6.9.1 Actividad de fármacos en las transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226

Para este ensayo se utilizó el método de microdilución en placa con el compuesto resazurina (Martin y Palomino, 2012 y Agrawal *et al.*, 2015. Brevemente, en una placa de 96 pozos conteniendo 50 μ L de medio Middlebrook 7H9 adicionado con ADC se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los fármacos de primera línea para evaluar un rango de concentraciones específico para cada uno de ellos (Tabla 6) en un volumen final de 100 μ L. El inóculo de cada uno de los pozos se realizó a partir de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento (2.7 McFarland, equivalente a 0.6 DO), el cual se diluyó en una relación 1:1000, se colocaron 50 μ L de inóculo en cada uno de los pozos. Para control de viabilidad de las cepas analizadas se utilizó medio de cultivo sin fármacos. La placa se incubó a 37 °C con agitación constante de 300 rpm durante 40 h. Posteriormente, se agregaron 30 μ L de resazurina (0.2 mg/mL) a cada pozo y se incubó la placa por 6 h más bajo las mismas condiciones. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron mediante el cambio de coloración del compuesto resazurina. Cuando se observa un cambio de color azul a rosa significa que hay crecimiento bacteriano debido a que la resazurina (color azul) se reduce a resorufina (color rosa). El ensayo se realizó por lo menos por duplicado para cada una de las condiciones evaluadas.

Tabla 6. Rango de concentración de los fármacos en el método de microdilución en placa para *M. smegmatis*.

Fármaco	Abreviatura	Rangos de concentración (μ g/mL)
Isoniazida	INH	256 - 0.25
Rifampicina	RIF	50 - 0.05
Etambutol	ETB	8 - 0.05

Adaptado de Agrawal *et al.*, 2015.

6.9.2 Cinéticas de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* con los fármacos RIF, INH y STR

Las cinéticas de crecimiento de *Mycobacterium* se llevaron a cabo en cultivos líquidos con medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de ADC. Brevemente, se activaron por 24 h las cepas de *M. smegmatis*, *M. smegmatis* pMV261 y *M. smegmatis* sobreexpresando LipG (pMV261-LipG), LipH (pMV261-LipH), LipU (pMV261-LipU), y MSMEI_6226 (pMV261- MSMEI_6226) se activaron por 24 h y posteriormente los cultivos fueron ajustados al estándar 1 de McF; se sembraron 10 µL del cultivo se sembraron en un volumen de 1 mL de medio Middlebrook 7H9 más 10% de ADC y 20 µg/mL de kanamicina además se agregaron los fármacos a evaluar utilizando las siguientes concentraciones: RIF 3.12, 1.6 y 0.8 µg/mL, INH 32.0, 16.0 y 8.0 µg/mL y STR 0.5, 0.25, 0.12 µg/mL (las concentraciones de STR fueron elegidas debido a los resultados obtenidos con la lipasa LipF (Arriaga-Guerrero *et al.*, 2020). Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación constante, tomándose lecturas cada 3 h durante 27 h, monitoreando el crecimiento micobacteriano en unidades de McFarland usando el equipo DensiCHEK™ plus VITEK (Biomérieux).

Por otro lado, este mismo ensayo se realizó registrando las mediciones de crecimiento en densidad óptica (D.O.) utilizando el equipo Epoch2 (Biotek, Vermont, USA). El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos usando 4,500 células por pozo en un volumen total de 200 µL, el cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante tomando mediciones cada hora y media. Los resultados fueron analizados usando Microsoft office Excel.

6.9.3 Unidades formadoras de colonias en medio conteniendo RIF e INH

Para identificar si al sobreexpresarse LipH se modificaba la resistencia a fármacos, se evaluaron unidades formadoras de colonias (UFC), 100 µL de cultivo fresco (crecido por 20 h y ajustado a 1 McF) fueron inoculados en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de ADC, 0.05% de tween 80, con 20 µg/mL de kanamicina y agregando el fármaco a evaluar (0, 0.8 µg/mL de RIF, o bien 8 µg/mL de INH). Estos cultivos fueron incubados a 37 °C durante 22.5 h, el inóculo se llevó a la dilución 1:10,000 y 100 µL fueron sembrados en medio sólido Middlebrook 7H10 suplementado con 10%

de OADC. Estos medios fueron incubados a 37 °C durante 3 días y las colonias fueron contadas. El ensayo se realizó por duplicado biológico y triplicado técnico.

6.10 Evaluación de la morfología colonial de las cepas sobreexpresando lipasas

Se evaluaron cambios en la morfología colonial de *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226. Se utilizaron 100 µL de cultivo fresco (crecido por 20 h) y fueron inoculados en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de ADC y 0.05% de tween 80, y cultivado a 37 °C durante 20 h. El inóculo se ajustó a 1 de McFarland, se sembraron 100 µL de la dilución 1:10,000 en medio sólido Middlebrook 7H10 suplementado con 10% de OADC. Estos medios fueron incubados a 37 °C durante 3 días y las colonias fueron evaluadas mediante el uso del microscopio EVOS cell imaging systems, usando los objetivos de 4X y 10X. El análisis cuantitativo se realizó mediante el programa ImageJ tomando 10 colonias para evaluar tamaño y 3 colonias para ancho de borde colonial.

6.11 Silenciamiento de diferentes lipasas en *M. smegmatis*

El silenciamiento de lipasas se realizó usando el sistema de CRISPRi-Cas9 con el plásmido pLJR962 el cual fue gentilmente donado por la Dra. Sarah Fortune (Harvard T.H. Chan, USA). Este plásmido contiene la región codificante para la enzima Cas 9, a la cual se realizaron mutaciones en el sitio activo, por lo cual no realiza el corte en la cadena de DNA, pero puede ser guiado hasta el gen que nos interese inhibir usando un RNA guía (Rock *et al.*, 2017).

6.11.1 Diseño de RNA guía para la inhibición de lipasas

Se realizó el diseño de los RNA guía para inhibir las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226, utilizando las recomendaciones indicadas por Rock *et al.*, 2017 (Tabla 7).

Tabla 7. Diseño de RNA guías para inhibir lipasas de *M. smegmatis* por CRISPRi

Lipasa	PAM	Represión	Nombre	RNAg
LipG	AGAGG	216.7 fold	RNAg_LipG	GGGAGCCGGGATCACCCATGTCCTC
LipH	AGAAC	120.5 fold	RNAg_LipH	GGGAATACTGAATTGGCCGAAATCC
LipU	AGGAC	25.5 fold	RNAg_LipU	GGGAGCGACAGCCTGCGGCCAGAGC
MSMEI_6226	AGGAT	64.7 fold	RNAg_6226	GGGAATCGCCGCGGCGGCGATCAGG G

Niveles de represión teóricos, basados en el estudio realizado por Rock *et al.*, 2017.

6.11.2 Realización de la construcción pLJR962-RNAg_LipH

La secuencia del RNA guía fue añadida a un fragmento de DNA sintético (gBlock) el cual se diseñó y ordenó a la empresa Integrated DNA Technologies (San José, California, USA); esta secuencia contiene la región del vector pLJR962 flanqueada por las enzimas *EcoRI* y *SalI* y se intercambió el sitio de la enzima *BsmBI* por la secuencia de los RNA guía (Figura 16).

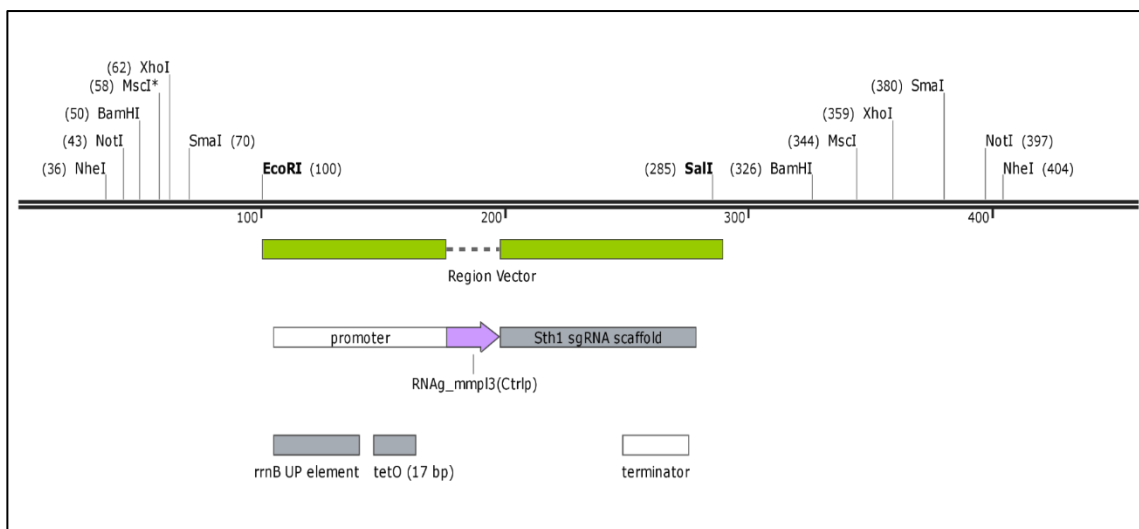


Figura 16. Diseño del fragmento de DNA sintético conteniendo los guías de las lipasas. Se muestran los sitios de restricción enzimáticos, así como el sitio de las enzimas *EcoRI* y *SalI* utilizadas para la ligación en el vector pLJR962. En verde se muestra la región correspondiente al vector y en flecha morada la región que corresponde al RNA guía. Imagen realizada usando SnapGene 5.1 Software.

La ligación de este fragmento dentro del vector pLJR962 se realizó en una proporción 1:3 (vector:fragmento), usando 97.4 ng de DNA de pLJR962 y 6.18 ng del gBlock, ambos fueron digeridos usando una unidad de las enzimas *EcoRI* y *SalI* más el Buffer 3.1 (New England Biolabs, Massachusetts, USA). La reacción de digestión se incubó a 37 °C por 2 h continuando con una inactivación a 65 °C durante 20 min, finalizada la incubación las muestras se colocaron en hielo y se procedió con la ligación añadiendo 1 U de ligasa T4 (New England Biolabs, Massachusetts, USA) y 1 mM de ATP (Invitrogen Massachusetts, USA). La reacción se incubó a 16 °C durante toda la noche, posteriormente se transformaron 10 µL de la ligación en *E. coli* DH5α.

6.11.3 Caracterización de las construcciones pLJR92-RNAg_LipH

Para caracterizar los candidatos de la construcción pLJR962-RNAg_LipH se realizó una PCR punto final usando los primers del RNA guía (RNAg_LipH_Forward 5'-GGGAATACTGAATTGGCCGAAATCC-3') y un primer que alinea en la región del vector (primer seq_primer_1834 5'-TTCCTGTGAAGAGCCATTGA-3'), estandarizada a las siguientes condiciones: buffer Taq 1×, dNTPs 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM y 1 U de Taq

DNA polimerasa. El programa utilizado para la amplificación consistió en un paso de desnaturalización 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, de alineamiento a 55 °C por 1 min, y de extensión a 72 °C por 1 minuto, y un paso final de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron separados y visualizados usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red Nucleic Acid (Biotium, California, USA) y fotodocumentadas utilizando el equipo Multidoc-it digital imaging system (UVP, California, USA). Finalmente se realizó la secuenciación del candidato usando el primer primer seq_primer_1834. Las construcciones pLJR962-LipH y PLRJ962-mmpL3 (utilizada como control) fueron purificadas usando el kit QIAprep spin miniprep kit y posteriormente electroporadas en *M. smegmatis* usando el protocolo descrito anteriormente. La caracterización de estas construcciones se realizó mediante secuenciación automatizada.

6.12 Inhibición de la lipasa LipH en *M. smegmatis*

Para este ensayo se utilizó a *M. smegmatis* tipo silvestre, así como las transformantes de *M. smegmatis* pLJR962-LipH, pLJR962-Ctrl. De igual manera, como control del sistema CRISPRi se utilizó a la transformante de *M. smegmatis* pLJR962-mmpL3. La inhibición de la lipasa LipH se realizó mediante la adición de 100 ng/mL de anhidrotetraciclina (ATc) a medio 7H9 conteniendo 10% de ADC el cual fue incubado durante 20 h y 27 h con agitación constante 300 rpm a 37 °C. Las muestras tratadas fueron evaluadas mediante RT-qPCR para comprobar la inhibición de la lipasa como se describió con anterioridad.

6.13 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se realizaron ANOVA de medidas repetidas usando el programa IBM SPSS Statistics 22 para analizar cinéticas de crecimiento, así como comparaciones de rango por Mann-Whitney, usando el programa GraphPad Prism 6, para analizar diferencias en análisis de expresión de las lipasas, análisis de UFC/mL y análisis morfología colonial. Se consideró que los valores eran estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$ y altamente significativo cuando $P < 0.01$.

7. RESULTADOS

7.1 Silenciamiento de la región codificante de lipasas en *M. smegmatis*

7.1.1 Caracterización del vector pLJR962

Para llevar a cabo la inhibición de las lipasas en *M. smegmatis* mediante CRISPRi se utilizó el vector pLJR962 (Rock *et al.*, 2017). Este vector fue transformado en *E. coli* DH5α y se caracterizó mediante digestión enzimática usando la endonucleasa *Apa* I la cual, realiza tres cortes en el vector generando tres fragmentos de 4,988 pb, 3,087 pb y 1,901 pb (Figura 17A). Se observaron estos tres fragmentos en la electroforesis en gel de agarosa al 1% para los candidatos 1, 2, 3 y 5, los cuales corresponden a los tamaños esperados (Figura 17B).

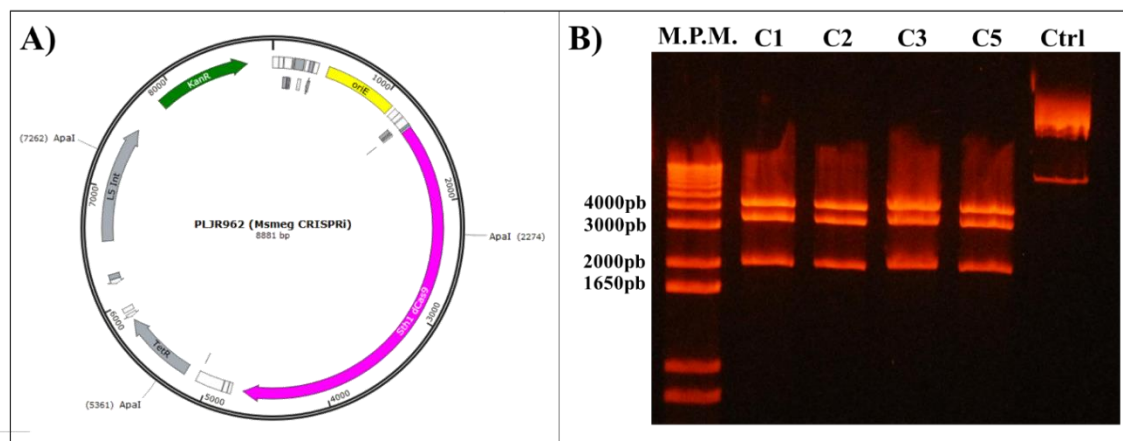


Figura 17. Caracterización del vector pLJR962 mediante digestión enzimática usando *Apa*I. A) Mapa del vector mostrando los sitios de corte de la enzima *Apa*I, realizado mediante SnapGene. B) Visualización de los fragmentos generados de la digestión enzimática con la enzima *Apa*I en el vector pLJR962. M.P.M.: Marcador de peso molecular 1Kb Plus, C1-5: Candidatos 1-5, Ctrl: Control negativo de digestión (Mezcla de digestión en ausencia de la enzima de restricción *Apa*I utilizando el Candidato 1 como control).

7.1.2 Diseño de RNA guías para la inhibición de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226

Se diseñaron los RNA guía (RNAg) para dirigir el silenciamiento de genes mediante el sistema CRISPR-Cas9. El diseño de los RNAg se realizó usando las indicaciones publicadas por Rock *et al.* (2017). Se diseñaron cuatro RNAg, uno para cada

lipasa, teniendo niveles de represión estimados desde 25.5 a 216.7 veces dependiendo de las secuencias PAM utilizadas para cada uno (Tabla 7).

7.1.3 Realización y caracterización de la construcción pLJR962-mmpL3

Se realizó la construcción de pLJR962 con el RNA guía control (5'-GCGACAGACTGGCTGCCCTGCCCTCGTC-3'), el cual inhibe al gen mmpL3 de *M. smegmatis* (Rock *et al.*, 2017). Este gen es considerado vital en la micobacteria, por lo tanto, al inhibirlo la bacteria muere y de esta manera se comprueba que el sistema está funcionando. Se obtuvo una eficacia del 80% en la realización de la construcción pLJR962-mmpL3 (Figura 18B). Los candidatos se caracterizaron mediante PCR punto final usando un primer que alinea en una región cercana al terminador (Seq-Primer1834) y un primer correspondiente a la región del RNA guía (RNAg_Lip-F) (Figura 18A). La fidelidad de la secuencia se verificó para el candidato 1, en el cual no se encontraron mutaciones en la región correspondiente al plásmido, además de comprobar que contenía la secuencia del RNAg de mmpL3 (Figura 19).

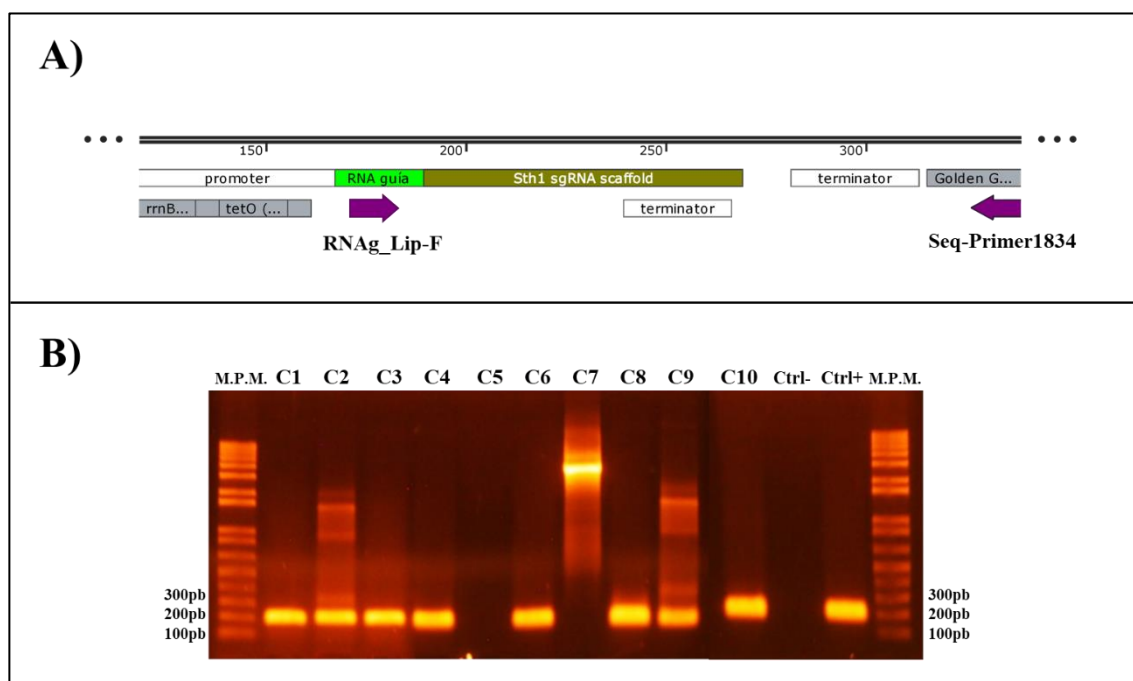


Figura 18. Identificación de la construcción pLJR962-RNag_mmpL3 mediante PCR. A) esquema indicando donde alinean los primers utilizados para la caracterización. B) PCR para identificar la construcción pLJR962-RNag_mmpL3. M.P.M., Marcador de peso molecular 1Kb; C, candidato; Ctrl-, control negativo (Agua libre de nucleasas); Ctrl+, control positivo.

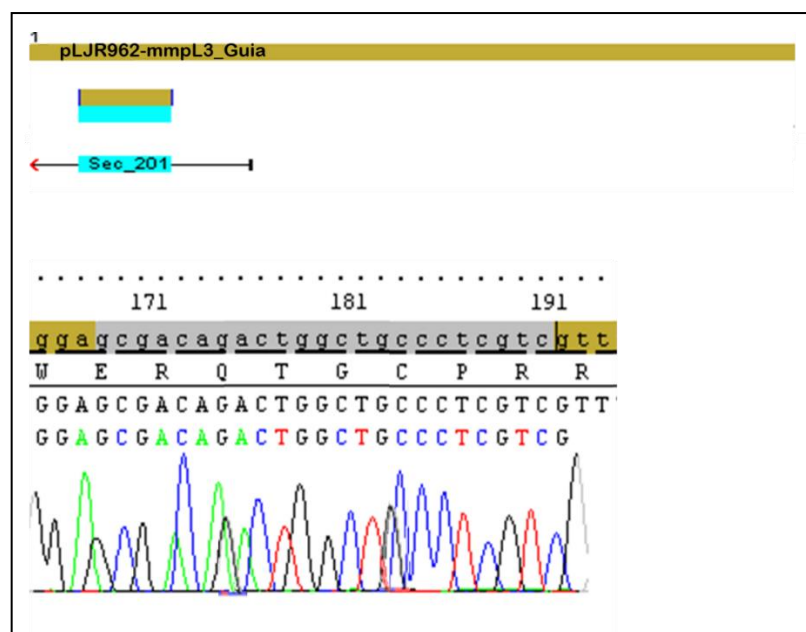


Figura 19. Secuencia nucleotídica de la construcción pLJR962-RNAg_mmpL3 del candidato 1. Línea dorada representa la secuencia de referencia, en celeste se muestra la secuencia alineada con la referencia, en gris se muestra la región que comprende al RNA guía de mmpL3. Datos analizados usando el programa Seqscape V.2.7

Una vez comprobada la presencia del RNA guía en la construcción pLJR962-RNAg_mmpL3, se realizó la transformación de *M. smegmatis* mediante electroporación, obteniéndose aproximadamente 200 candidatos, de los cuales uno de estos fue aislado y caracterizado para realizar ensayos posteriores.

7.1.4 Realización y caracterización de la construcción pLJR962-LipH y pLJR962-Ctrl

Las construcciones de pLJR962-LipH y pLJR962-Ctrl se realizaron usando la metodología descrita previamente. Se realizó una caracterización por PCR y se obtuvo un producto de amplificación esperado de aproximadamente 200 pb en los 6 candidatos evaluados (Figura 20 y Figura 21). El candidato 1 de cada construcción (pLJR962-LipH y pLJR962-Ctrl) se purificó y se comprobó la fidelidad de la secuencia mediante secuenciación automatizada, observándose la secuencia del RNA guía integra sin la presencia de mutaciones (Figura 22 y Figura 23).

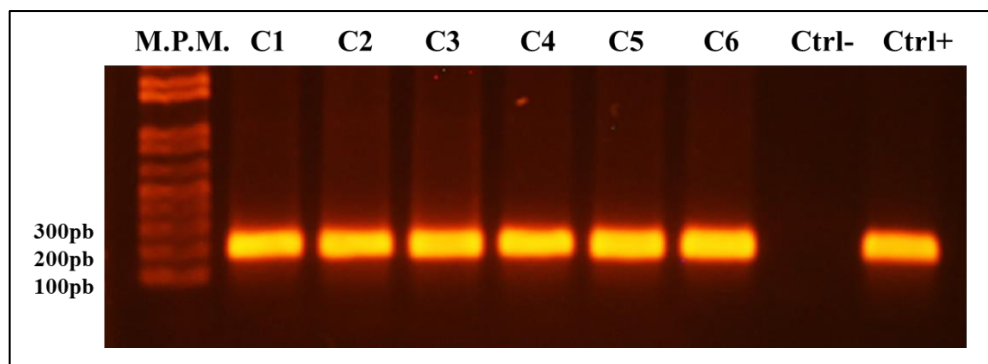


Figura 20. Caracterización de los candidatos pLJR962-LipH en *E. coli*. M.P.M., Marcador de peso molecular 1Kb; C1-6, candidatos 1-6 de pLJR962; Ctrl-, control negativo (Agua libre de nucleasas); Ctrl+, control positivo.

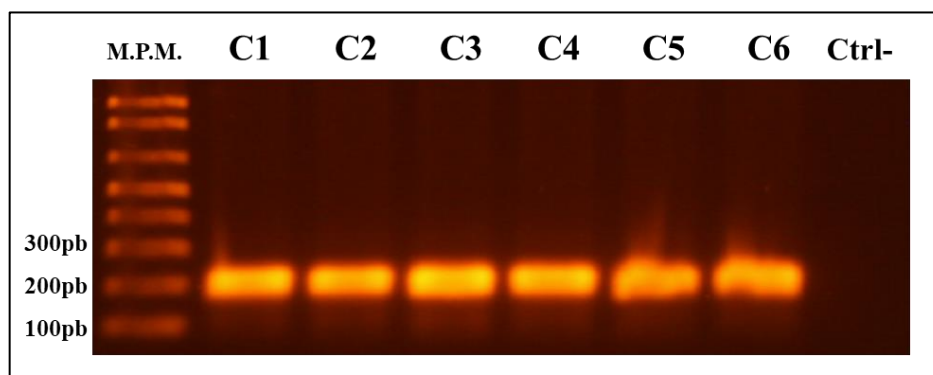


Figura 21. Caracterización de los candidatos pLJR962-Ctrl en *E. coli*. M.P.M., Marcador de peso molecular 1Kb; C1-6, candidatos 1-6 de pLJR962-Ctrl; Ctrl-, control negativo (Agua libre de nucleasas).

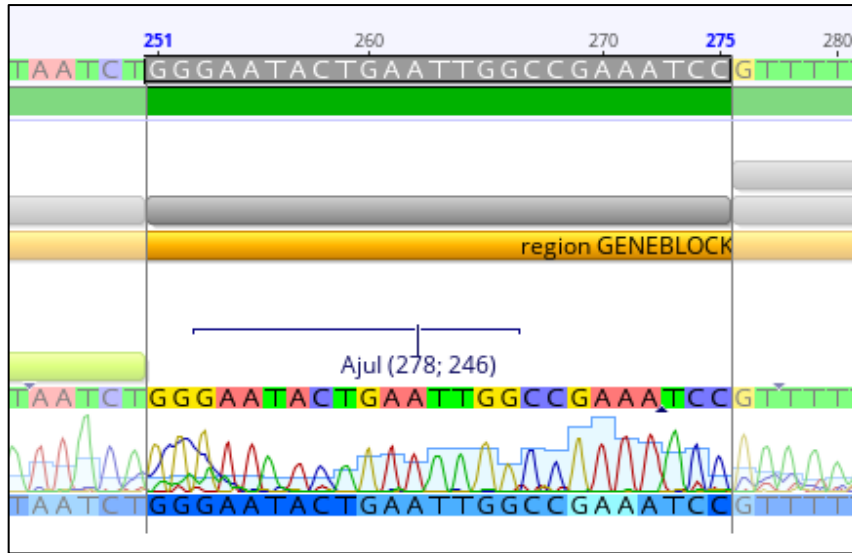


Figura 22. Secuencia nucleotídica de la construcción pLJR962-LipH del candidato 1. Se muestra el electroferograma señalando en gris la secuencia correspondiente al RNAg LipH (251-275 pb). Análisis usando el programa Genious prime V.2020.0.4.

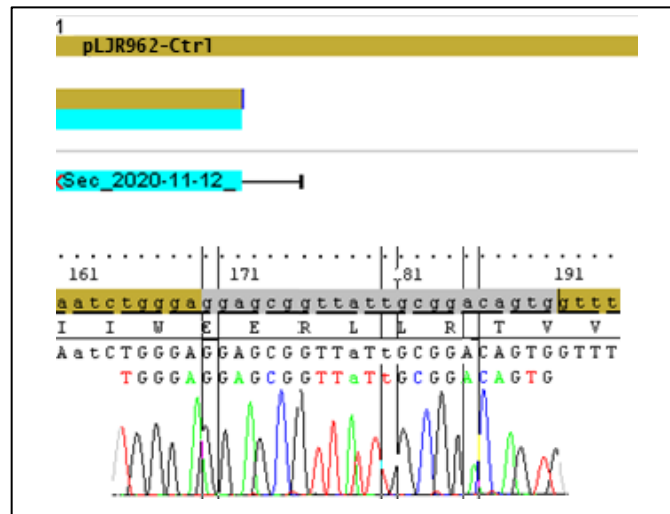


Figura 23. Secuencia nucleotídica de la construcción pLJR962-Ctrl del candidato 1. Línea dorada representa la secuencia de referencia, en celeste se muestra la secuencia alineada con la referencia, las líneas azules dentro de la región dorada representan mutaciones, en gris se muestra la región que comprende al RNA guía de Ctrl. Datos analizados usando el programa Seqscape V.2.7

Posteriormente, las construcciones pLJR962-LipH y pLJR962-Ctrl fueron introducidas por electroporación en *M. smegmatis* y se obtuvieron más de 50 candidatos para cada construcción; uno de estos fue evaluado mediante PCR (pLJR962-LipH, candidato 3, pLJR962-Ctrl, candidato 1. Se observó la amplificación del fragmento esperado de aproximadamente 200 pb (Figura 24 y Figura 25).

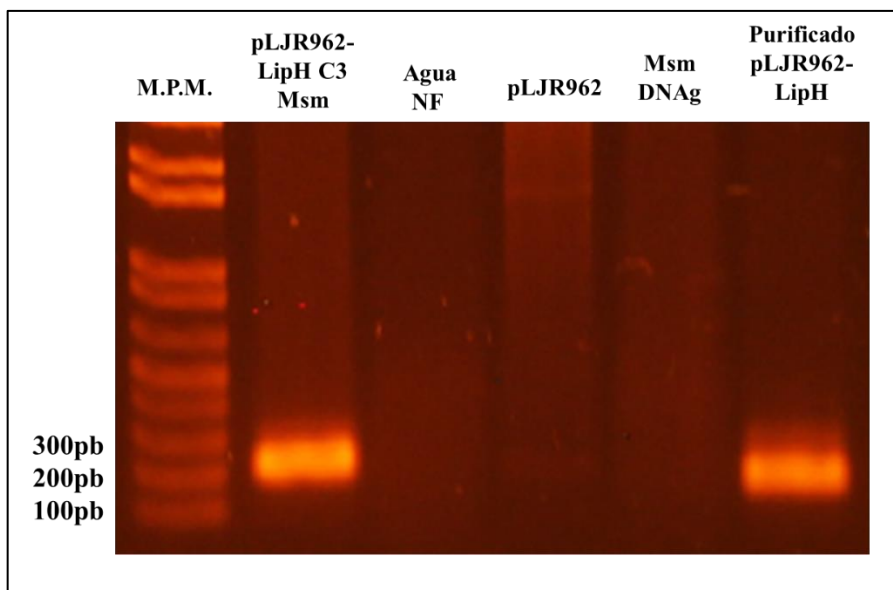


Figura 24. Caracterización del candidato 3 de *M. smegmatis* pLJR962-LipH. M.P.M. Marcador de peso molecular 1 Kb

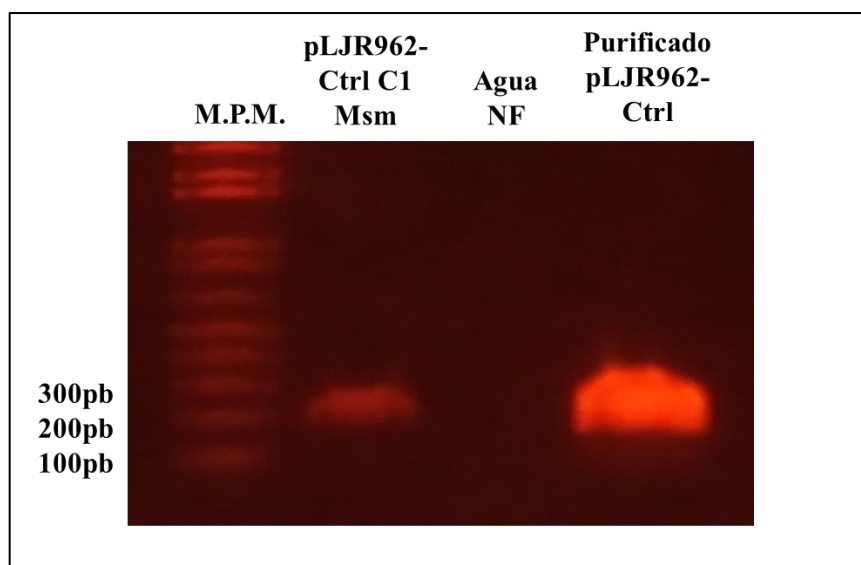


Figura 25. Caracterización del candidato 3 de *M. smegmatis* pLJR962-Ctrl. M.P.M. Marcador de peso molecular 1 Kb.

7.1.5 Inhibición de la lipasa LipH en *M. smegmatis*

La inhibición de la lipasa LipH se llevó a cabo mediante la adicción de ATc como se detalla en la sección de metodología. Los resultados fueron evaluados a las 20 h y 27 h de incubación. Sin embargo, los resultados obtenidos aún no son concluyentes.

7.2.1 Sobreexpresión de lipasas en *M. smegmatis*

Para llevar a cabo la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226, las secuencias codificantes se subclonaron en el vector pEXP5-CT TOPO como vector de tránsito; una vez caracterizadas las secuencias subclonadas, estas fueron liberadas del vector de tránsito mediante digestión enzimática y subclonadas en el vector pMV261 y se obtuvieron las construcciones pLJR962-LipG, pLJR962-LipH, pLJR962-LipU y pLJR962-MSMEI6226.

7.2.1.1 Amplificación de la región codificante de las lipasas LipG, LipH, LipU, MSMEI_6226 de *M. smegmatis*.

Con la finalidad de amplificar la secuencia codificante de las lipasas LipG, LipH, LipU, MSMEI_6226, se realizó la extracción de DNA genómico (DNAG) de *M. smegmatis*; se obtuvo una cantidad de 249.9 ng/μL con una pureza de 2.05 (260/280, Figura 26A). Las regiones codificantes de las lipasas fueron amplificadas por PCR usando el DNAG extraído de *M. smegmatis* y los *primers* diseñados para cada región (Tabla 4). Para las reacciones de amplificación se utilizaron condiciones estándar, descritas con anterioridad en la sección de metodología. Se obtuvieron fragmentos de amplificación de 918 pb para *lipG*, 1,143 pb para *lipH*, 957 pb para *lipU* y 1,014 pb para MSMEI_6226 (Tabla 4, figura 26B).

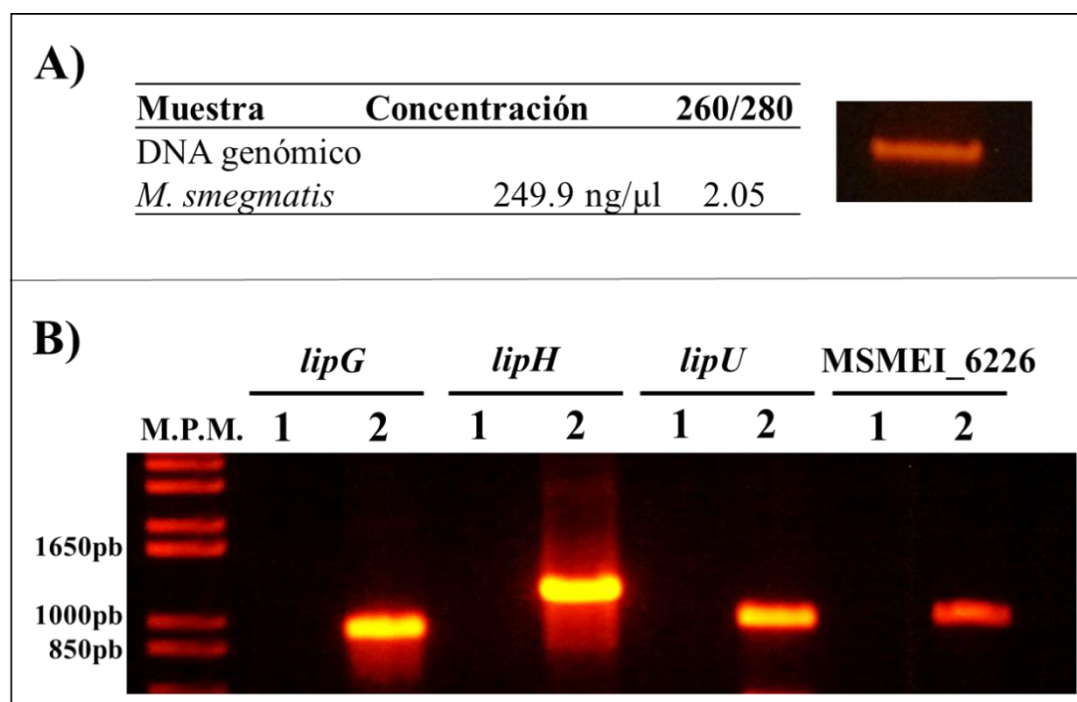


Figura 26. Amplificación de la secuencia codificante de LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 de *M. smegmatis*. A) Extracción de DNA genómico de *M. smegmatis* mc²155. B) Amplificación de *lipG*, *lipH*, *lipU* y MSMEI_6226 de *M. smegmatis*. M.P.M., Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1, control negativo PCR (Agua libre de nucleasas); 2, Amplificación a partir de DNA genómico de *M. smegmatis* como templado.

7.2.1.2 Clonación de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en el vector pEXP5-CT TOPO

La secuencia codificante de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 fueron subclonadas en el vector de tránsito pEXP5-CT TOPO. Las construcciones se caracterizaron mediante PCR para verificar la presencia de la región de interés de cada una de las lipasas (Figura 27). La fidelidad de la secuencia se comprobó mediante secuenciación automatizada sin identificar mutaciones en la secuencia codificante en las lipasas LipG, LipH, y LipU (Figura 28). La lipasa MSMEI_6226 mostró una mutación en la posición 738, un cambio de guanina a adenina (Anexo 1), este error podría ser debido a una falla de la *Taq* polimerasa (Rango de error de 10^{-6} mutaciones/pb amplificadas). Sin embargo, este cambio corresponde a una mutación silente, que no modifica el aminoácido codificado, por lo que se decidió continuar trabajando con esta construcción.

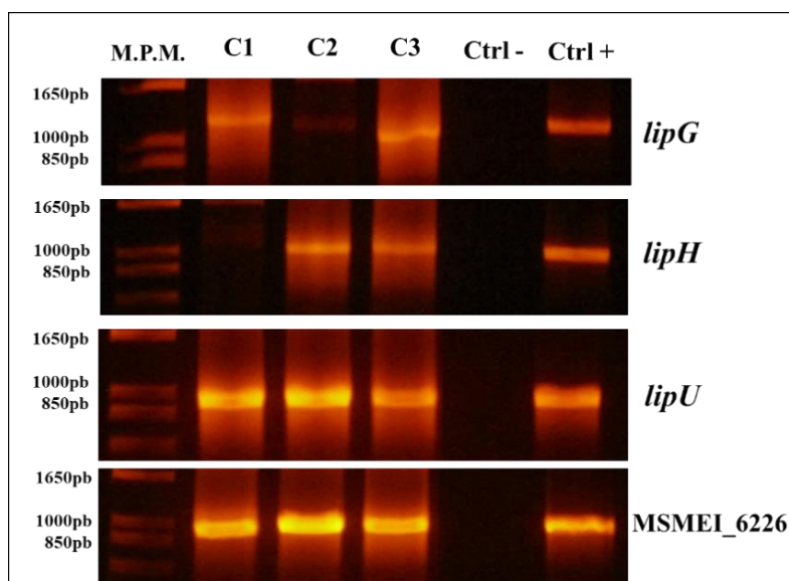


Figura 27. Amplificación de las secuencias codificantes de LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 a partir de candidatos en el vector pEXP5-CT TOPO. M.P.M., Marcador de peso molecular; C1, Candidato 1; C2, Candidato 2; C3, Candidato 3; Ctrl -, Control negativo usando agua libre de nucleasas; Ctrl +, Control positivo usando DNA genómico de *M. smegmatis*.

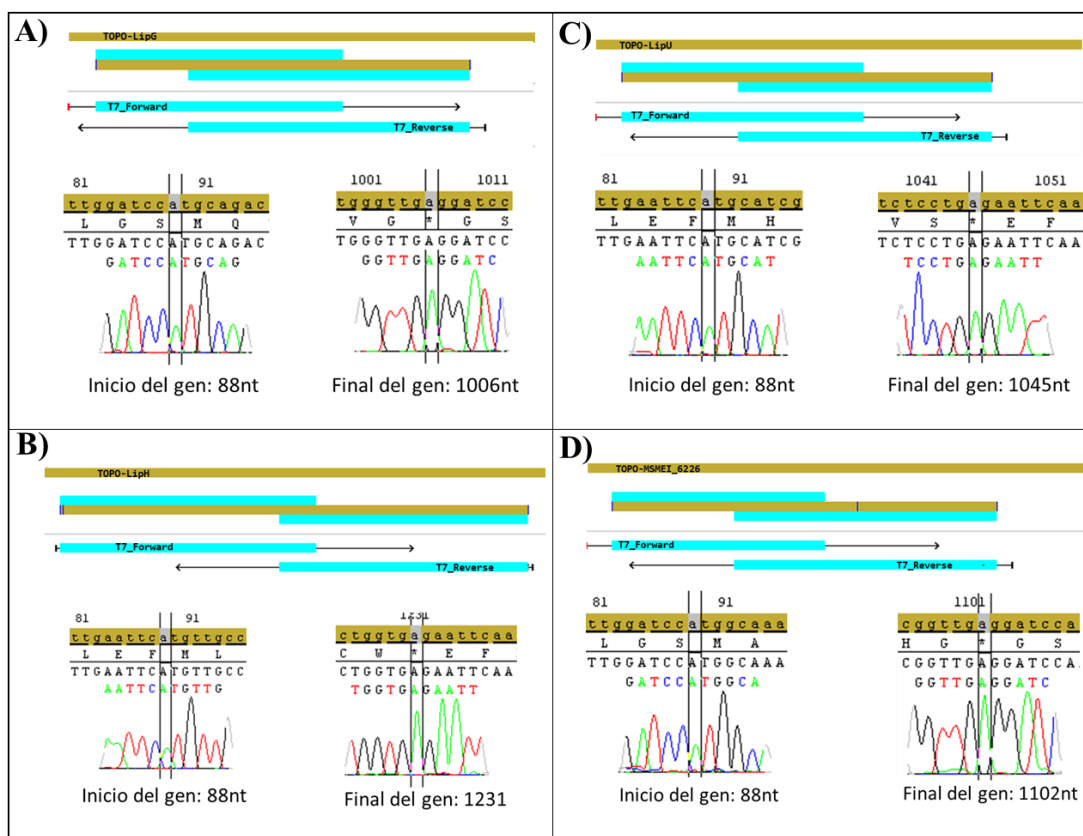


Figura 28. Secuencia nucleotídica codificante de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI 6226 a partir de las construcciones de en el vector pEXP5-CT TOPO. A) Secuenciación del candidato TOPO-LipG; B) Secuenciación del candidato TOPO-LipH; C) Secuenciación del candidato TOPO-LipU; D) Secuenciación del candidato TOPO-MSMEI_6226. Línea dorada representa la secuencia de referencia, en celeste se muestra la secuencia alineada con la referencia, líneas azules dentro de la región dorada representan mutaciones, en gris se muestra la región que comprende a la secuencia codificante de las lipasas (LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226). Datos analizados en el programa CLC sequence viewer 7.

7.2.1.3 Subclonación de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en el vector pMV261

Una vez caracterizadas las construcciones pEXP5-CT TOPO-lipasas, se realizó la subclonación de las secuencias codificantes correspondientes en el vector micobacteriano pMV261. Primeramente, los fragmentos correspondientes a la región codificante de cada lipasa se liberaron mediante digestión enzimática del vector pEXP5-CT TOPO, y se realizó la linearización del vector pMV261 usando las endonucleasas *Bam*H I ó *Eco*R I (Figura 29).

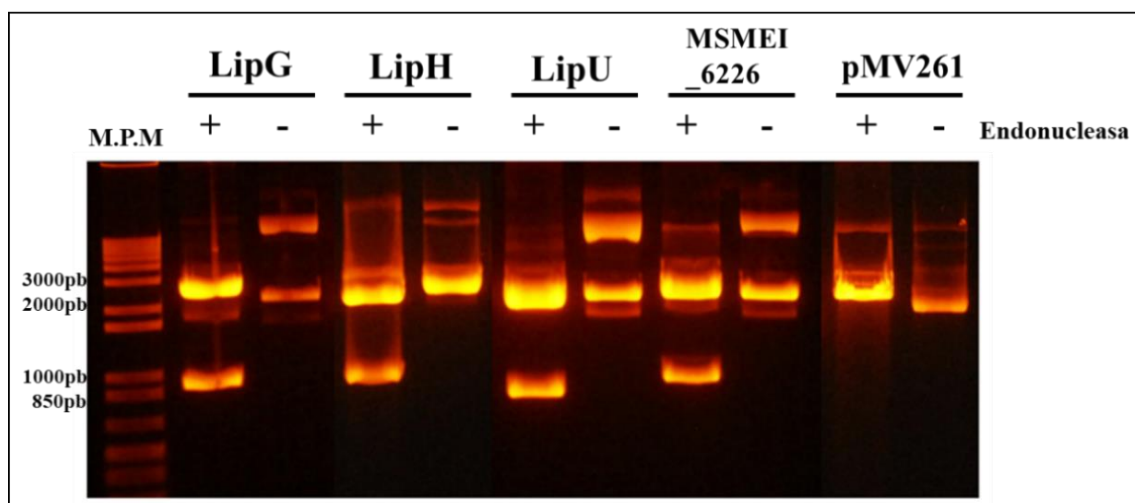


Figura 29. Digestión enzimática de las construcciones pEXP5-CT TOPO-LipG, pEXP5-CT TOPO-LipH, pEXP5-CT TOPO-LipU, pEXP5-CT TOPO-MSMEI_6226 y del vector pMV261. Las construcciones pEXP5-CT TOPO-LipG y pEXP5-CT TOPO-MSMEI_6226 fueron digeridas usando la endonucleasa *BamH* I, Las construcciones pEXP5-CT TOPO-LipH y pEXP5-CT TOPO-LipU fueron digeridas usando la endonucleasa *EcoR* I y el vector pMV261 fue linearizado usando la endonucleasa *BamH* I ó *EcoR* I.

Las secuencias codificantes liberadas del vector pEXP5-CT TOPO fueron insertadas en el vector pMV261, previamente linearizado, siguiendo las condiciones descritas en la sección de metodología. Posteriormente, se realizó la transformación en *E. coli* DH5 α con cada una de las construcciones. Se aislaron candidatos y se comprobó la presencia de la secuencia codificante de cada una de las lipasas mediante PCR punto final; además, se realizó la caracterización de la direccionalidad del gen dentro del vector pMV261 mediante PCR punto final, usando combinaciones de los primers forward y reverse de cada lipasa (Tabla 4) y el primer pMV261-F (5'-GTTGTAAGTGCTTGTGGTGGCA-3'), identificándose a los candidatos que presentaban el gen de interés subclonado en dirección sentido para cada construcción pMV261-lipasa (Figura 30).

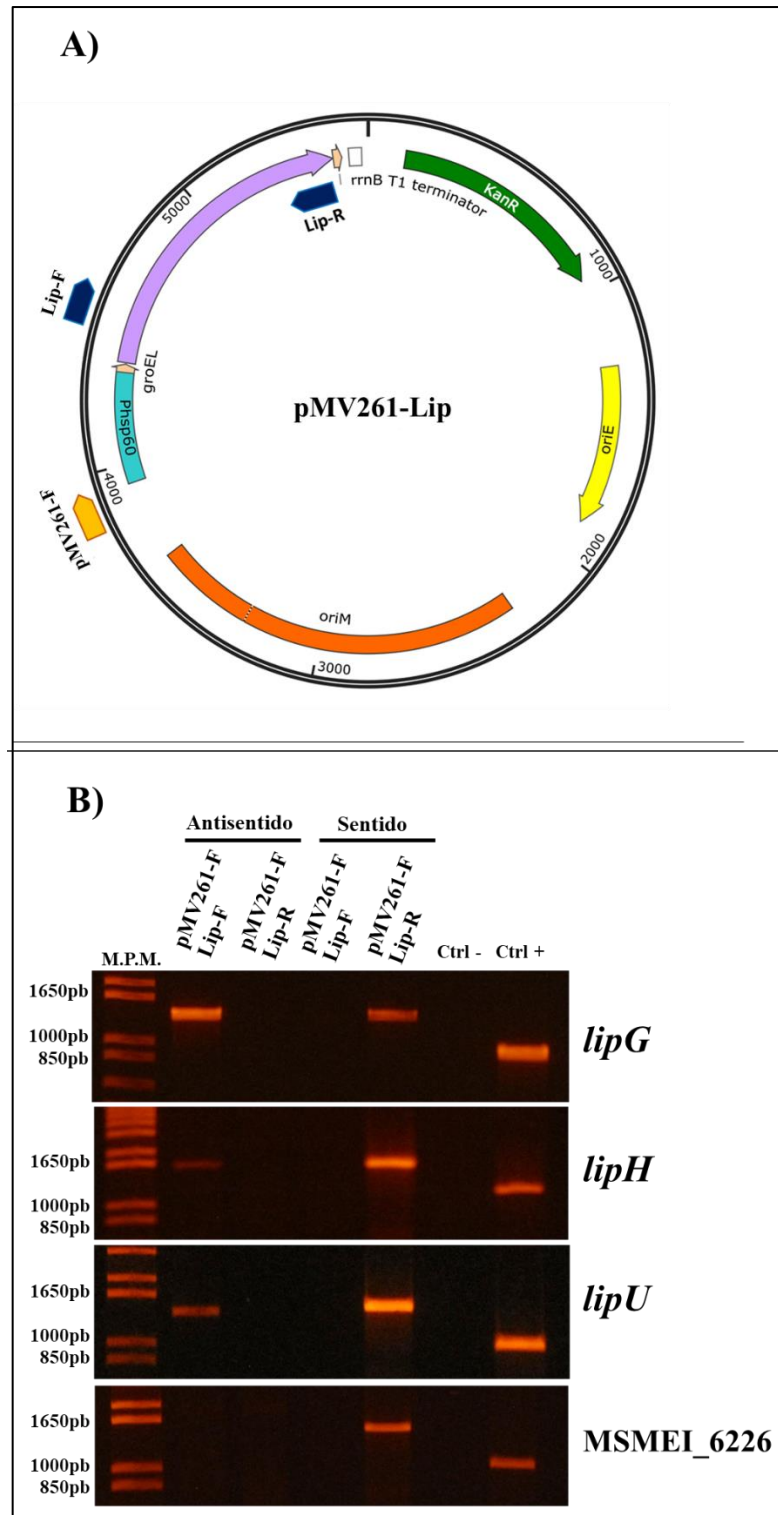


Figura 30. Caracterización de las construcciones plasmídicas con lipasas en pMV261 mediante PCR.
A) Mapa representativo de las construcciones en el vector pMV261 mostrando el sitio de unión de los primers usados para la caracterización. Realizado usando Snapgene; B) PCR para definir orientación de la región codificante de las lipasas en las construcciones en el vector pMV261.

Una vez identificadas las construcciones en dirección sentido, éstas fueron purificadas mediante un kit de purificación de intercambio iónico, y se obtuvieron concentraciones superiores a los 48 ng/μL y relación 260/280 nm de 1.8 (Figura 31A), la integridad del DNA plasmídico extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 31B).

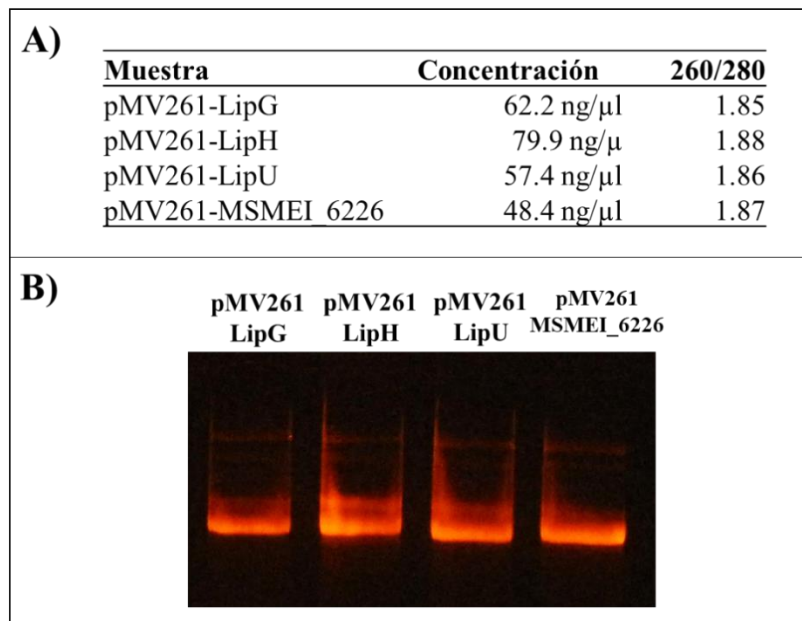


Figura 31. Concentración, pureza e integridad de las construcciones con las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en el vector pMV261. A) Determinación de la concentración y pureza de las muestras purificadas; B) Electroforesis en agarosa al 1% mostrando integridad de los plásmidos purificados mediante QIAprep spin miniprep kit.

7.2.1.4 Generación de transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226

Se realizó la electroporación de *M. smegmatis* con las construcciones purificadas, obteniéndose aproximadamente 100 candidatos en medio solido 7H10 suplementado con OADC conteniendo 20μg/mL de kanamicina, el cual fue utilizado como fármaco de selección (Figura 32). Uno de estos candidatos fue aislado y crecido en medio líquido 7H9 suplementado con ADC, a partir del cual se realizó extracción de DNA plasmídico para posteriormente ser caracterizado, obteniéndose la comprobación de la presencia de las

construcciones de pMV261-LipG, pMV261-LipH, pMV261-LipU y pMV261-MSMEI6226 en *M. smegmatis* por PCR.

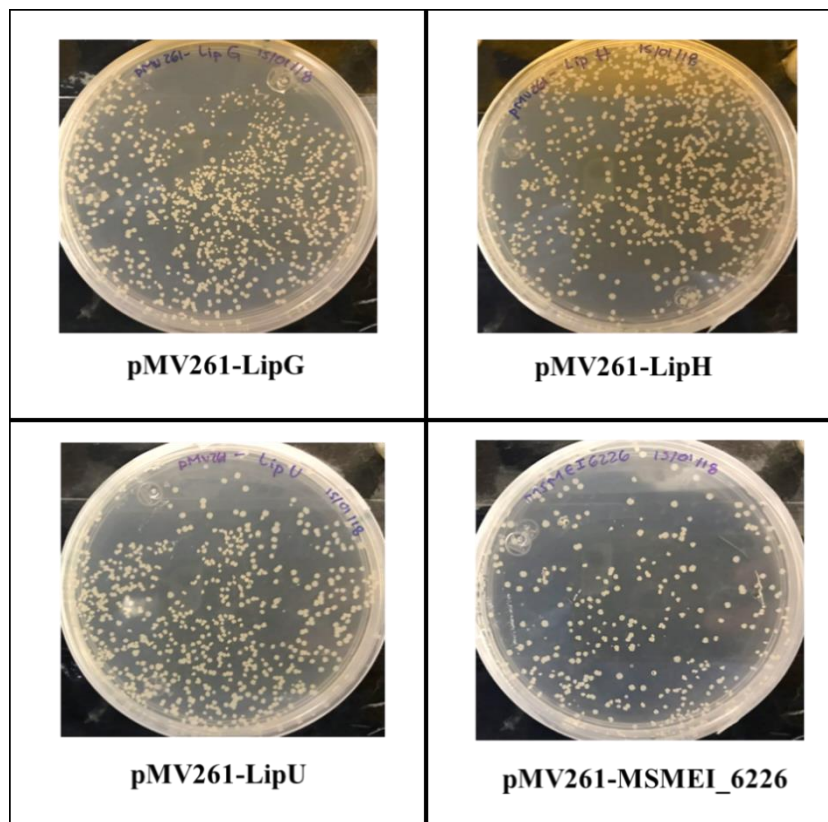


Figura 32. Cultivos de cepas de *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipU, LipH y MSMEI_6226. Bacterias transformadas con las construcciones de pMV261-LipG, pMV261-LipH, pMV261-LipU, pMV261-MSMEI6226. Se utilizó el fármaco de selección kanamicina a 20 µg/mL.

7.2.2 Comprobación de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en *M. smegmatis*

Para comprobar la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en las transformantes, primeramente, se realizó extracción de RNA total durante la fase de crecimiento exponencial de las bacterias sobreexpresando las lipasas (20-22h), este RNA extraído fue tratado con DNasa I para eliminar los restos de DNA que pudieran encontrarse como contaminantes de la extracción. Se observó la integridad en las subunidades del RNA 23s, 16s y 5s de las muestras extraídas (Figura 33). A partir del

RNA total obtenido, se sintetizó cDNA y posteriormente se realizó un ensayo para evaluar la completa eliminación del posible DNA presente en la muestra, usando las diferentes combinaciones: en ausencia y presencia de *DNasa I* y en ausencia y presencia de la enzima transcriptasa reversa MMLV en la retrotranscripción (Figura 34). Por último, la funcionalidad de los cDNA utilizados en el ensayo se comprobó mediante la amplificación del gen endógeno *sigA* por PCR punto final (Figura 35).

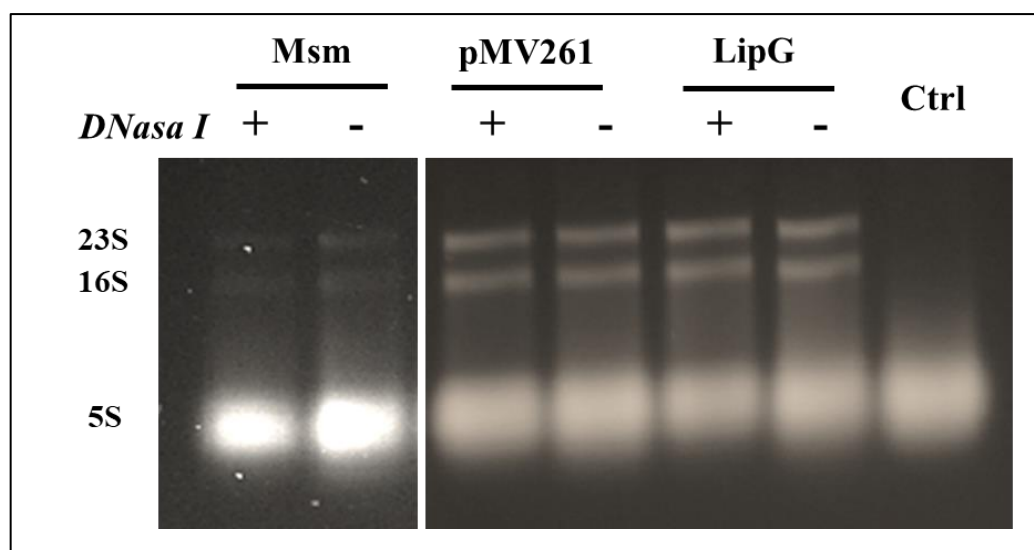


Figura 33. Extracción de RNA total con tratamiento de DNasa de las transformantes de *M. smegmatis*. Msm, RNA total de *M. smegmatis*; pMV261, RNA total de *M. smegmatis* transformada con el vector vacío pMV261; LipG, RNA total de *M. smegmatis* transformada con la construcción pMV261-LipG; Ctrl, RNA total de *M. smegmatis* transformada con pMV261 en presencia (+) y ausencia (-) de DNasa I, y tratamiento de calor. Imagen representativa.

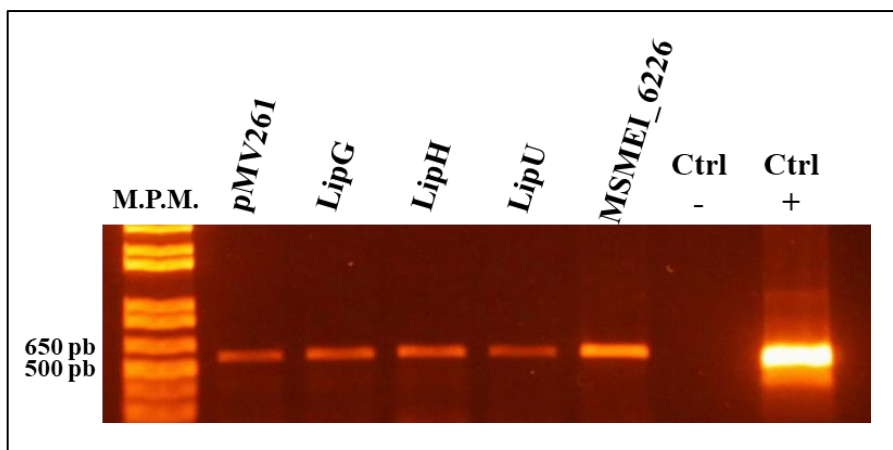


Figura 35. Amplificación de *sigA* para comprobar funcionalidad del cDNA de las transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU, MSMEI_6226. M.P.M., Marcador de peso molecular; Ctrl -, control negativo (Agua libre de nucleasas); Ctrl +, control positivo (DNA genómico de *M. smegmatis*).

La comprobación de la sobreexpresión se realizó utilizando el método comparativo con sondas TaqMan para cada una de las lipasas (*lipG*, *lipH*, *lipU*, MSMEI_6226) y usando como gen endógeno a *sigA*. Para llevar a cabo este ensayo, primeramente, se realizó el rango dinámico de amplificación para cada una de las sondas a utilizar (*lipG*, *lipH*, *lipU*, MSMEI_6226, *sigA*) usando las diluciones de 1:8 a 1:512 (Figura 36) (Anexos 2A, 3A, 4A y 5A), con estos datos se realizó una curva de regresión lineal para cada uno de los genes a evaluar, obteniéndose los valores recomendados de la pendiente y R^2 (Figura 37) (Anexos 2B, 3B, 4B y 5B), de esta manera se eligió la dilución 1:32 para realizar los ensayos de expresión, ya que permite la visualizar una sobreexpresión o inhibición del gen.

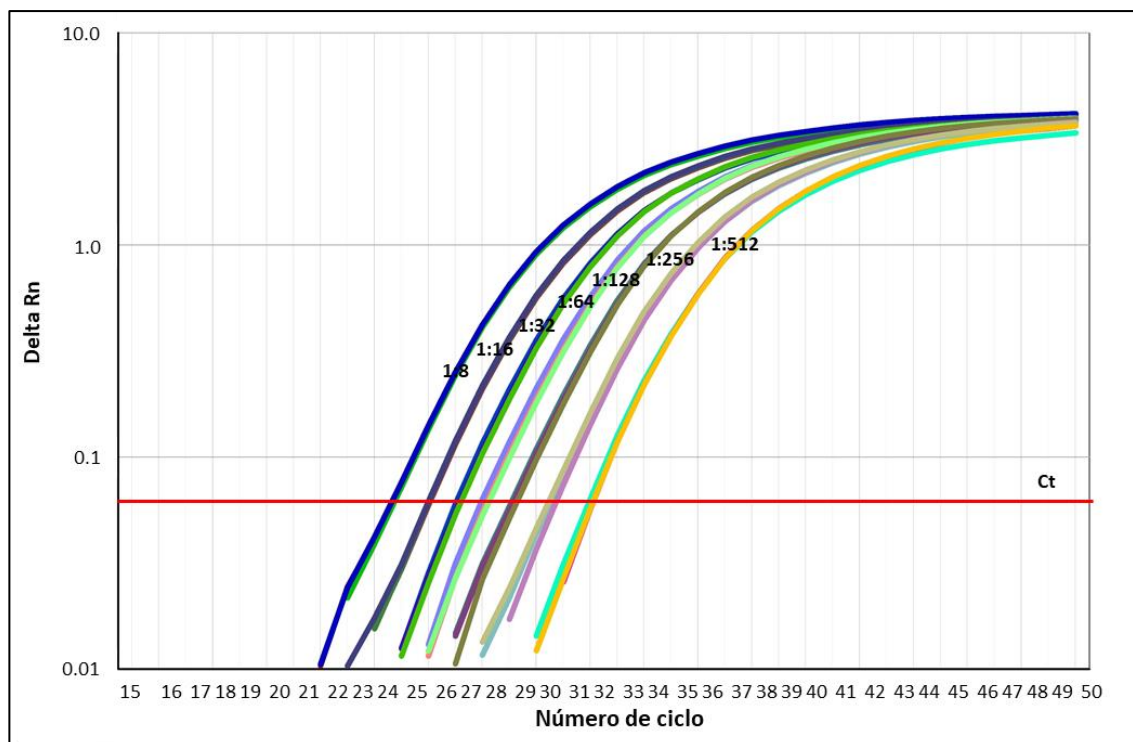


Figura 36. Rango dinámico de amplificación para el gen *sigA* de *M. smegmatis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriadas del cDNA de 1:8 a 1:512. Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de la fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *sigA* (Marcada con el fluoróforo FAM) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (Fluoróforo ROX) menos la línea basal. La línea verde horizontal representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para análisis cuantitativos. Se muestra como ejemplo el análisis del gen *sigA*.

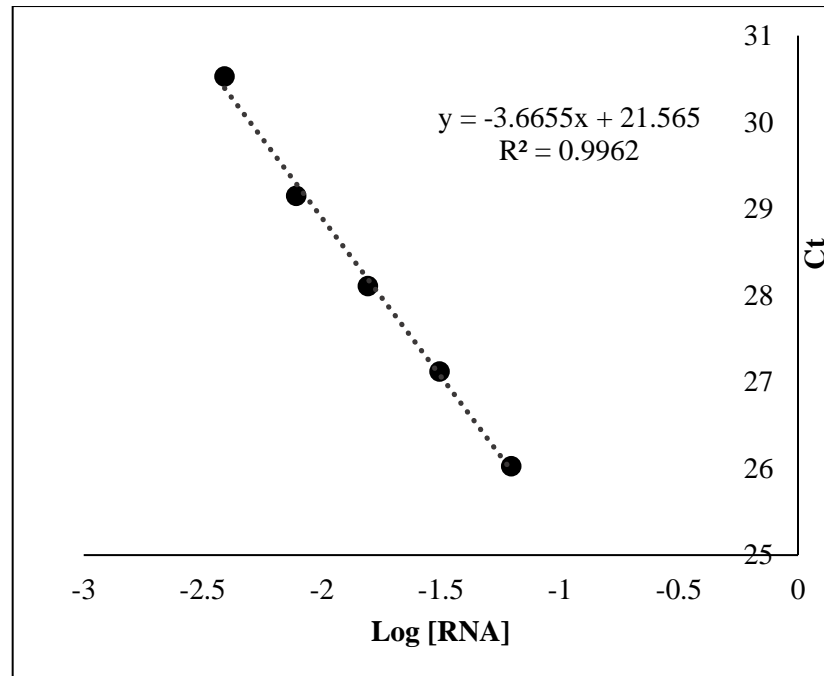


Figura 37. Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia del gen *sigA* de *M. smegmatis*. Se muestra el valor de Ct (ciclo umbral) con respecto a la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente (y) y el valor predictivo de confianza (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA (R^2 cercana a 1), respectivamente. Se muestra como ejemplo el análisis del gen *sigA*.

El ensayo de expresión para los genes *lipG*, *lipH*, *lipU* y MSMEI_6226 se realizó usando estas condiciones estandarizadas usando como control endógeno el gen *sigA* mediante el método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$, Livak y Schmittgen, 2001) para calcular la expresión relativa de dichos genes en las cepas *M. smegmatis* pMV261-LipG, pMV261-LipH, pMV261-LipU, pMV261-MSMEI6226 comparándolas contra su control directo *M. smegmatis* pMV261 y la cepa de *M. smegmatis* wild-type. Se obtuvo una sobreexpresión del gen *lipG* de aproximadamente 200 veces en la transformante *M. smegmatis* pMV261-LipG en comparación con la expresión de este gen en las cepas control (Figura 38), una sobreexpresión de aproximadamente 1000 veces del gen *lipH* en la transformante *M. smegmatis* pMV261-LipH (Figura 39) con respecto a la expresión de este gen en las cepas control, una sobreexpresión de aproximadamente 140 veces del gen *lipU* en la transformante *M. smegmatis* pMV261-LipU con respecto a la expresión de este gen en las cepas control (Figura 40) y una sobreexpresión de aproximadamente 220 veces del gen

MSMEI_6226 en la transformante *M. smegmatis* pMV261-MSMEI_6226 con respecto a la expresión de este gen en las cepas control (Figura 41).

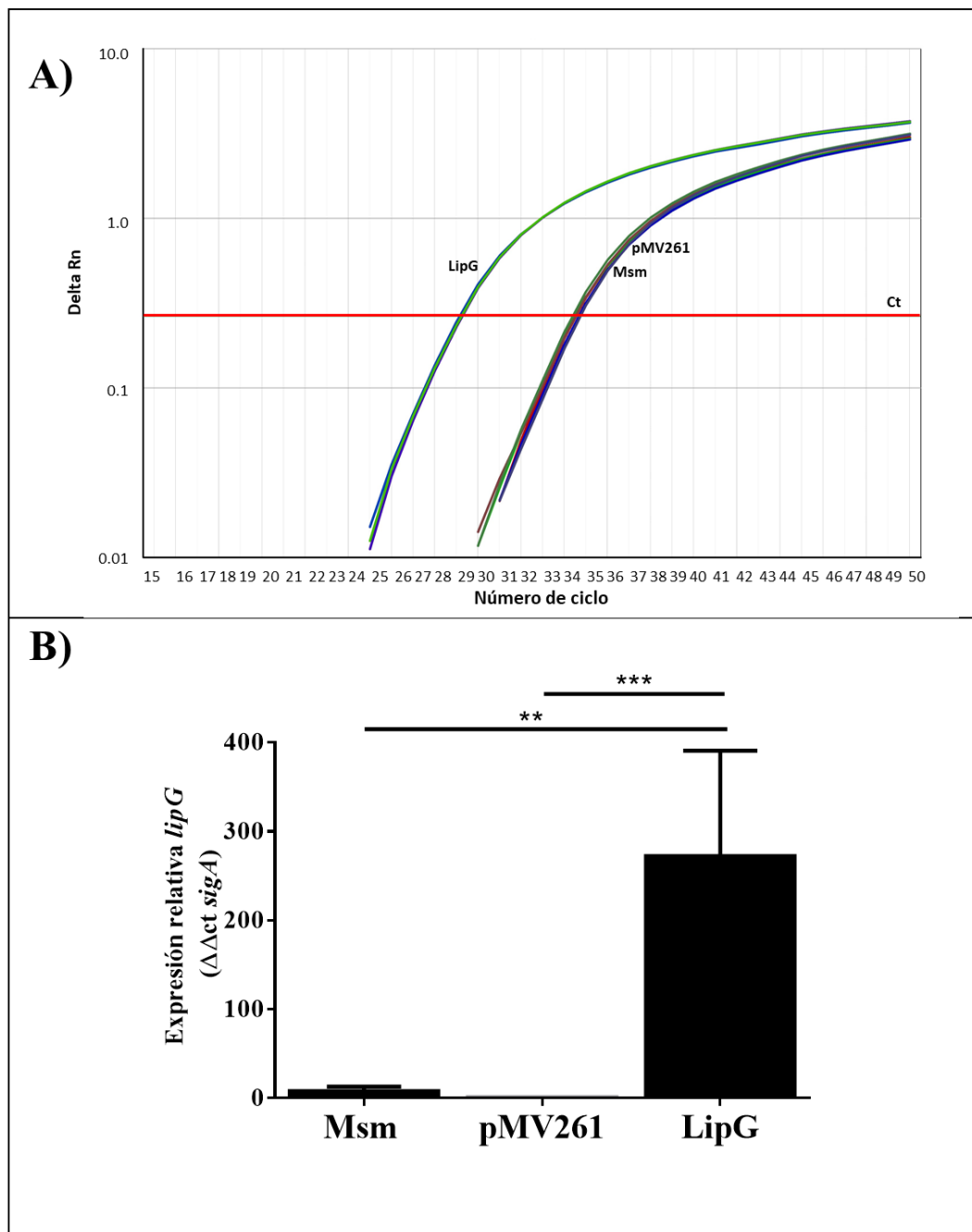


Figura 38. Sobreexpresión de LipG en *M. smegmatis*. A) Curva de amplificación, B) expresión relativa de LipG en *M. smegmatis*. Ensayo realizado utilizando duplicado biológico y triplicado técnico. Datos analizados usando el programa 7500 fast system SDS software V1.4.0.25. **, $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

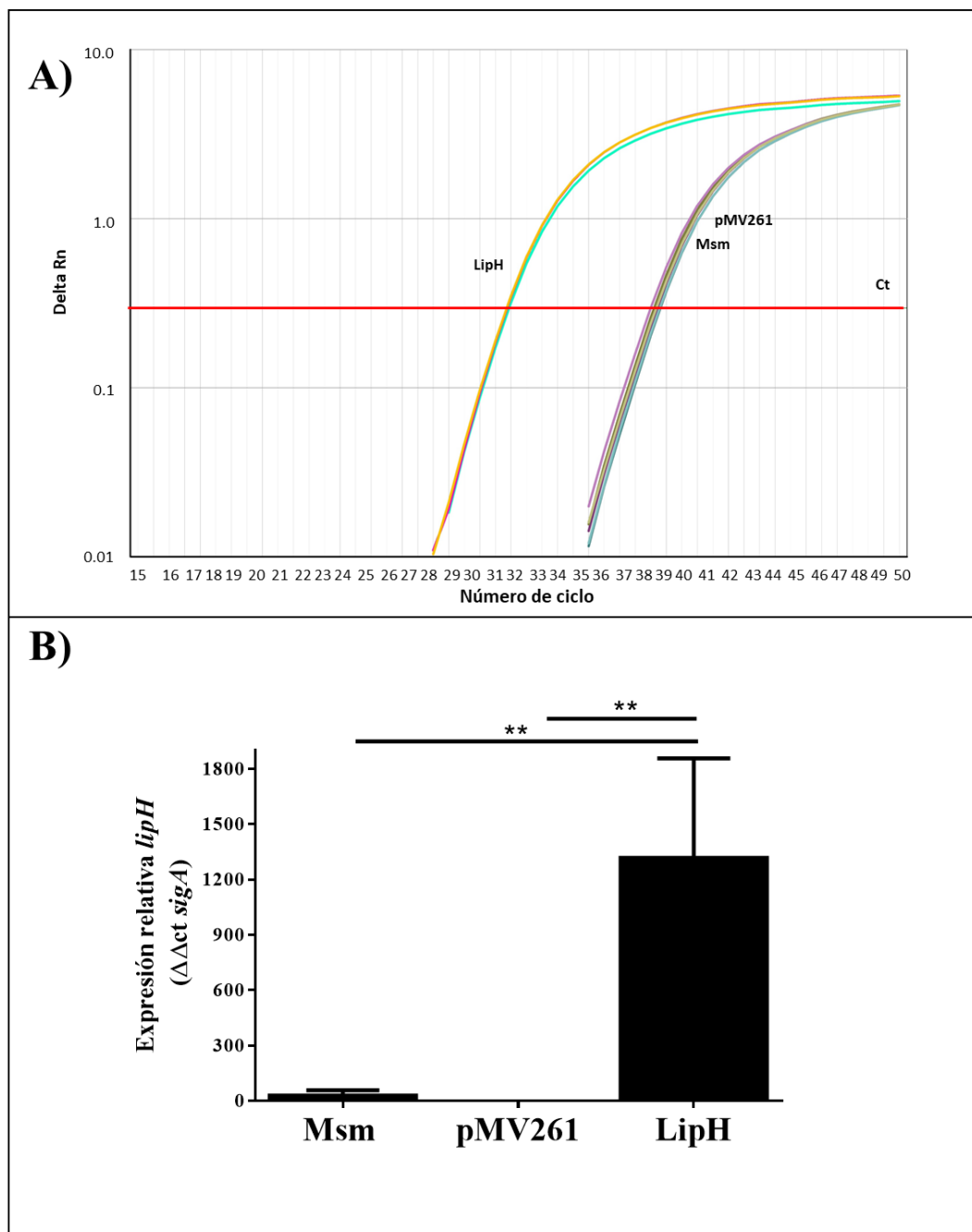


Figura 39. Sobreexpresión de LipH en *M. smegmatis*. A) Curva de amplificación, B) expresión relativa de LipH en *M. smegmatis*. Ensayo realizado utilizando duplicado biológico y triplicado técnico. Datos analizados usando el programa 7500 fast system SDS software V1.4.0.25. **, $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

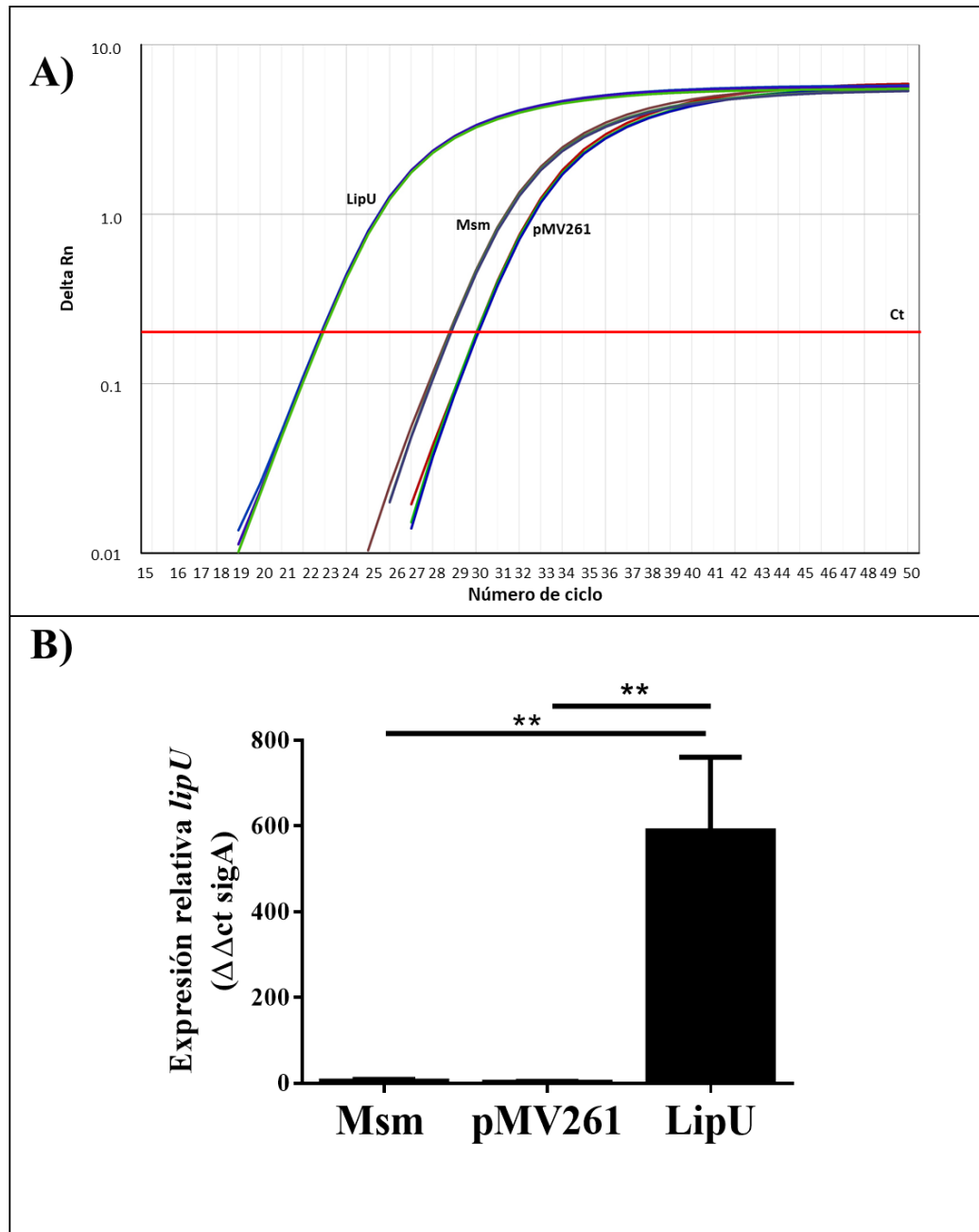


Figura 40. Sobreexpresión de LipU en *M. smegmatis*. A) Curva de amplificación, B) expresión relativa de LipU en *M. smegmatis*. Ensayo realizado utilizando duplicado biológico y triplicado técnico. Datos analizados usando el programa 7500 fast system SDS software V1.4.0.25. ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

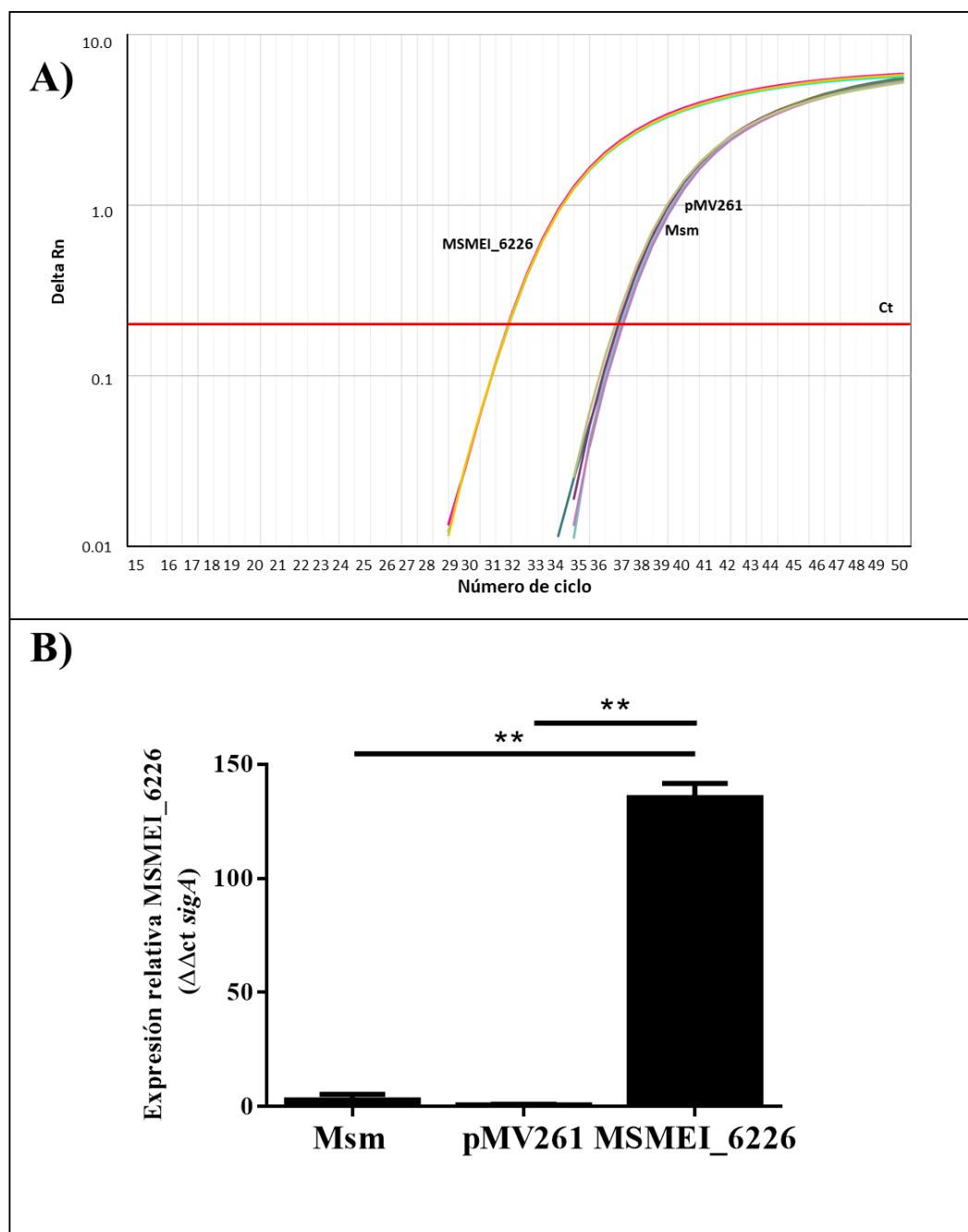


Figura 41. Sobreexpresión de MSMEI_6226 en *M. smegmatis*. A) Curva de amplificación, B) expresión relativa de MSMEI_6226 en *M. smegmatis*. Ensayo realizado utilizando duplicado biológico y triplicado técnico. Datos analizados usando el programa 7500 fast system SDS software V1.4.0.25. **, $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

7.3 Evaluación de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis*.

7.3.1 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en *M. smegmatis* en la condición de resistencia a fármacos mediante el ensayo REMA

La evaluación del efecto de la sobreexpresión de las lipasas en la resistencia a fármacos (INH, RIF y EMB) se llevó a cabo mediante el ensayo de microdilución en placa usando el compuesto resazurina. Se realizaron 3 réplicas biológicas, los resultados fueron representados como medias en la tabla 8 (Figura 42). Se obtuvieron los siguientes resultados: para el fármaco etambutol, no se identificó un cambio en la concentración mínima inhibitoria (CMI) al sobreexpresar las 4 lipasas en *M. smegmatis*. Para el fármaco isoniazida se observó un cambio en la CMI de 21.3 µg/mL a 16 µg/mL para las transformantes sobreexpresando las lipasas LipG y LipH, y de 21.3 µg/mL a 13.3 µg/mL para la transformante sobreexpresando la lipasa LipU, la transformante sobreexpresando MSMEI_6226 no mostró un cambio en la CMI para este fármaco. Al analizar el fármaco rifampicina se observó un cambio en la CMI de 1.2 µg/mL a 0.6 µg/mL para las transformantes sobreexpresando las lipasas LipH y LipU, además las cepas sobreexpresando LipG y MSMEI_6226 mostraron un cambio en la CMI de 0.3 y 1.8 µg/mL respectivamente en comparación con el control pMV261 (CMI de 1.2 µg/mL) (Tabla 8 y anexos 6, 7 y 8).

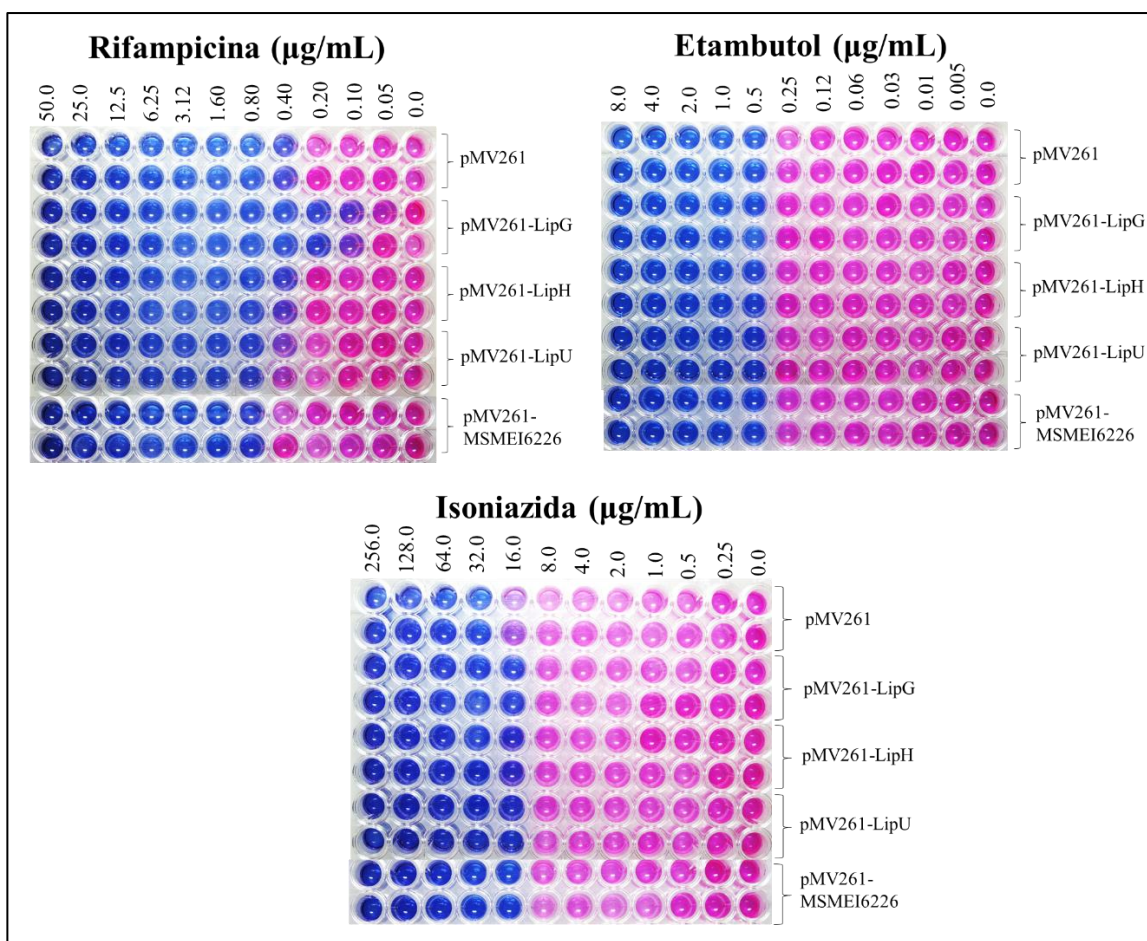


Figura 42. Evaluación de la sobreexpresión de lipasas en la resistencia a RIF, INH y EMB en *M. smegmatis*. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226. El medio de cultivo de las micobacterias contenía RIF, INH o EMB a las concentraciones indicadas además de 20 µg/mL de kanamicina. Los ensayos fueron realizados por duplicado. El cambio de color de azul a rosa indica crecimiento bacteriano. Imagen representativa de 3 réplicas biológicas.

Tabla 8. Efecto de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis*.

Transformantes (<i>M. smegmatis</i>)	Concentraciones mínimas inhibitorias (µg/mL)		
	RIF	INH	EMB
pMV261	1.2 ± 0.5	21.3 ± 7.5	0.5
pMV261-LipG	0.3 ± 0.3	16.0	0.5
pMV261-LipH	0.6 ± 0.2	16.0	0.5
pMV261-LipU	0.6 ± 0.2	13.3 ± 3.7	0.5
pMV261-MSMEI_6226	1.8 ± 0.9	21.3 ± 7.5	0.5

Ensayo realizado mediante el método de microdilución en placa usando el compuesto resazurina usando medio 7H9 suplementado con ADC y conteniendo el fármaco a evaluar en las concentraciones indicadas (EMB 8.0 a 0.005 µg/mL, INH 256.0 a 0.025 µg/mL y RIF 50.0 a 0.005 µg/mL), además de 20 µg/mL de kanamicina. RIF, rifampicina, INH, isoniazida, EMB, etambutol. Ensayo realizado por triplicado biológico y duplicado técnico, se muestran las medias de los tres ensayos con desviaciones estándar.

7.3.2 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en *M. smegmatis* en la condición de resistencia a fármacos mediante cinéticas de crecimiento

Para comprobar los resultados observados en el REMA, se realizaron cinéticas de crecimiento para los fármacos INH y RIF midiendo turbidez por MacFarland y densidad óptica (D.O.). Primeramente, para observar si la sobreexpresión de las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 no modificaba el crecimiento de las bacterias se realizaron cinéticas de crecimiento utilizando medio líquido y añadiendo solo el fármaco de selección (kanamicina 20µg/mL) utilizándose como control de crecimiento, este ensayo se realizó por duplicado biológico, observándose que algunas lipasas presentaban un cambio en su crecimiento (Figura 43 y anexo 9).

Posteriormente, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio líquido conteniendo el fármaco de selección (kanamicina a 20 µg/mL) más los fármacos de primera línea RIF e INH, a las concentraciones de 0.8, 1.6 y 3.12 µg/mL para el fármaco RIF y 8.0, 16.0 y 32.0 µg/mL para el fármaco INH para cada una de las transformantes.

7.4.2.1 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipG en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis* mediante cinéticas de crecimiento

En la transformante sobreexpresando LipG se observó un menor crecimiento utilizando los fármacos RIF e INH a las concentraciones de 0.8 µg/mL y de 8.0 µg/mL, respectivamente. Este efecto fue observado tanto en la medición de densidad óptica, como en la turbidez por unidades de McFarland (Figuras 44 y 45), en las concentraciones de 1.6 y 3.12 µg/mL de RIF, así como 16.0 y 32.0 µg/mL de INH no se observaron cambios (Anexos 10 y 12). De igual manera se analizó si la sobreexpresión de LipG modificaba la sensibilidad al fármaco estreptomycinina, encontrándose que la sobreexpresión de esta lipasa no modifica el crecimiento de la transformante en presencia de STR a las concentraciones de 0.5, 0.25 y 0.12 µg/mL (Anexo 11).

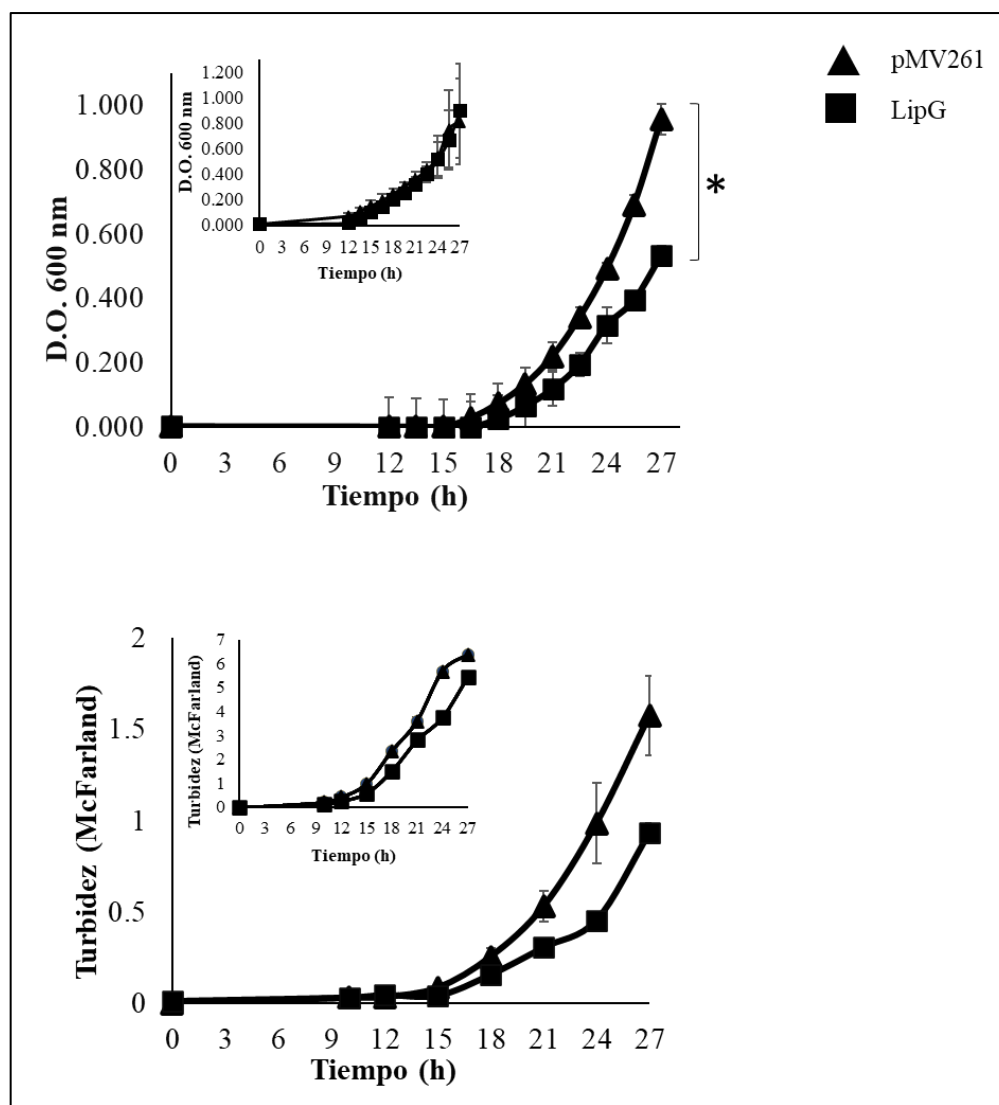


Figura 44. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipG en medio líquido conteniendo el fármaco RIF. El ensayo se realizó en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina más la concentración indicada de RIF a 0.8 $\mu\text{g/mL}$. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

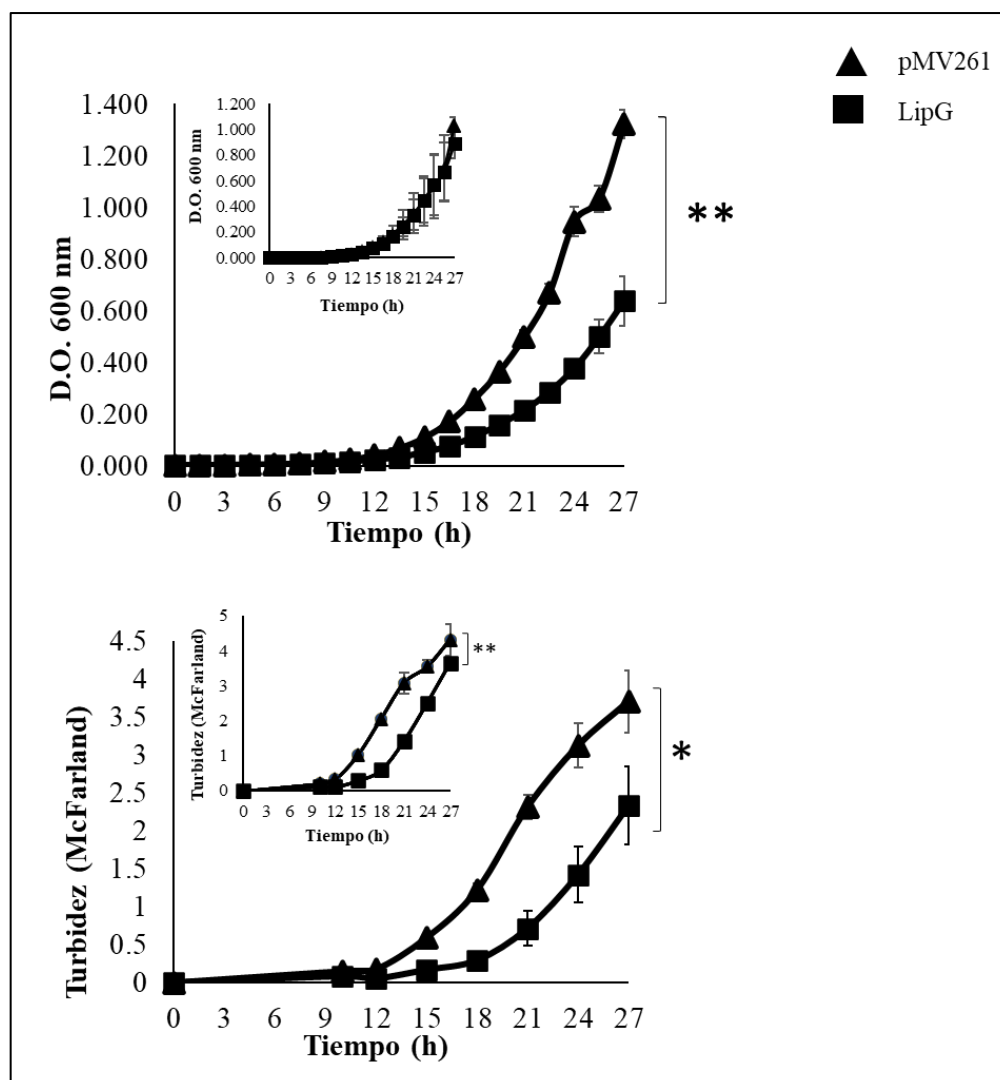


Figura 45. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipG en medio líquido conteniendo el fármaco INH. El ensayo se realizó en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina más la concentración indicada de INH a 8.0 $\mu\text{g/mL}$. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

7.4.2.2 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipH en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis* mediante cinéticas de crecimiento

Al sobreexpresar la lipasa LipH en *M. smegmatis* y evaluar su efecto en la resistencia a fármacos, se observó una mayor sensibilidad a las concentraciones de 0.8 $\mu\text{g/mL}$ de RIF y de 8.0 $\mu\text{g/mL}$ de INH al medir el crecimiento por densidad óptica. Sin

embargo, este efecto no se observó al medir turbidez mediante unidades de McFarland (Figura 46 y figura 47). Este mismo fenómeno se observó en las concentraciones de 1.6 $\mu\text{g/mL}$ de RIF y 16.0 $\mu\text{g/mL}$ de INH (Anexos 13 y 14). En las concentraciones 3.12 $\mu\text{g/mL}$ de RIF, así 32.0 $\mu\text{g/mL}$ de INH no se observó un cambio (Anexos 13 y 14). Al realizar cinéticas de crecimiento de la transformante sobreexpresando LipH utilizando el fármaco estreptomicina, se observó una mayor sensibilidad a este fármaco en las concentraciones de 0.12 $\mu\text{g/mL}$ y 0.25 $\mu\text{g/mL}$ mientras que al utilizar la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ no se observó modificación en el crecimiento (Figura 48).

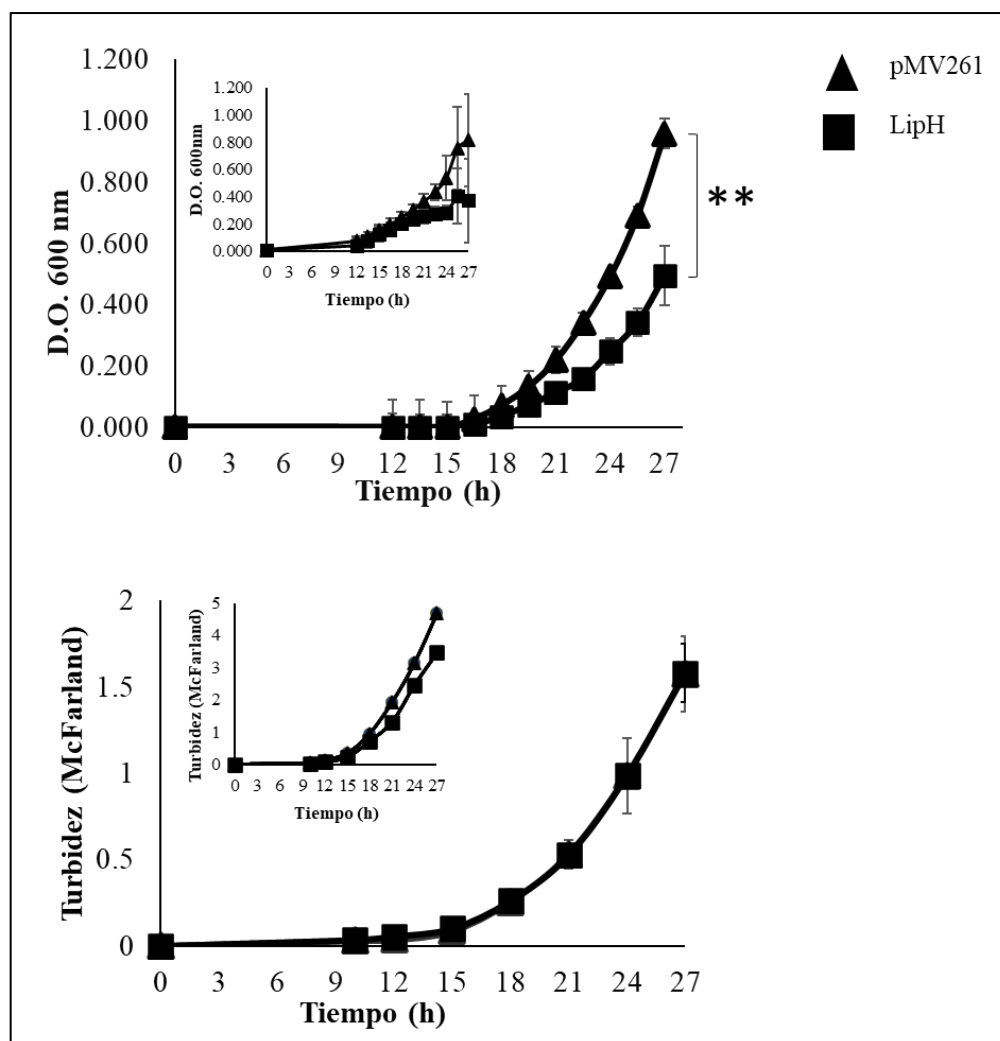


Figura 46. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH en medio líquido conteniendo el fármaco RIF. El ensayo se realizó en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más la concentración indicada de RIF a 0.8 µg/mL. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

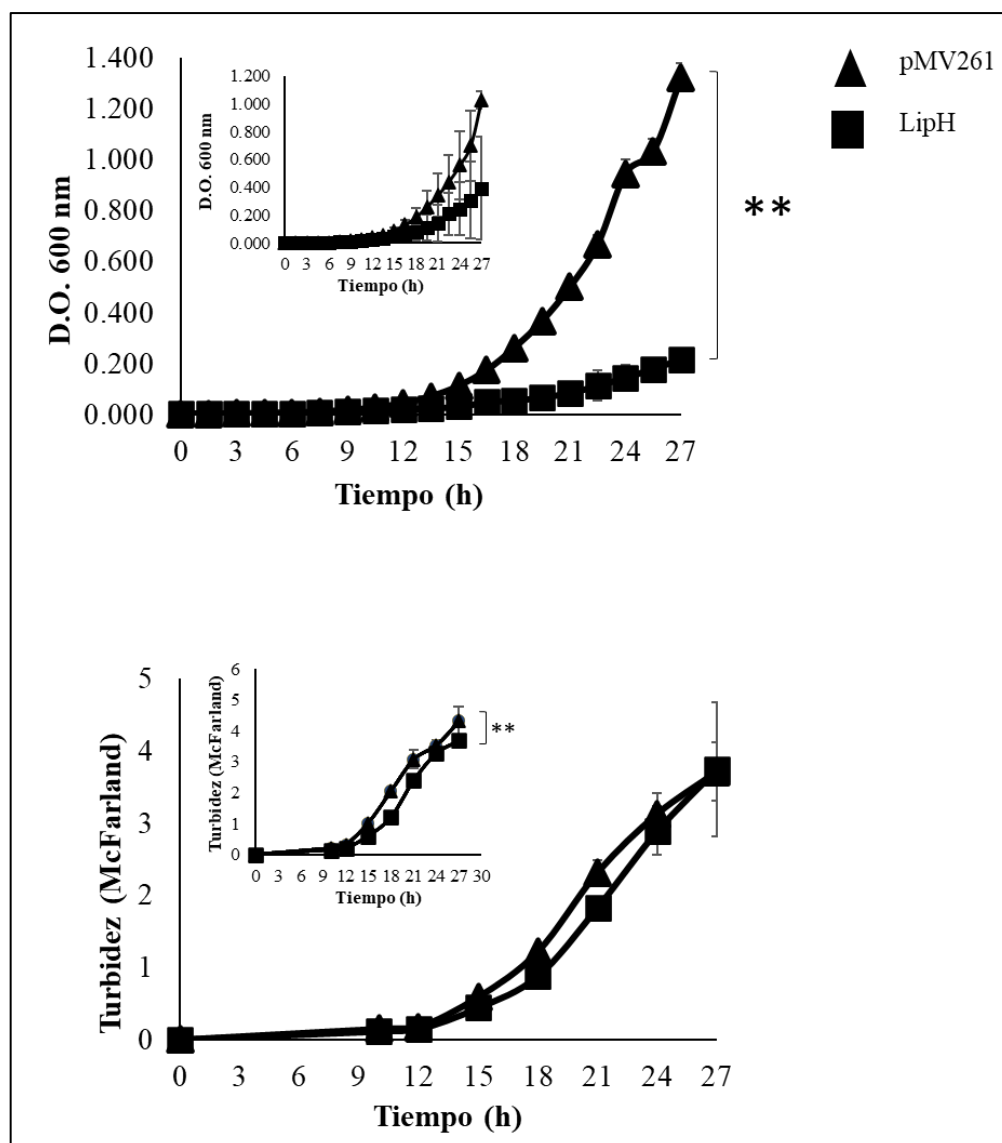


Figura 47. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH en medio líquido conteniendo el fármaco INH. El ensayo se realizó en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más la concentración indicada de RIF a 8.0 µg/mL. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

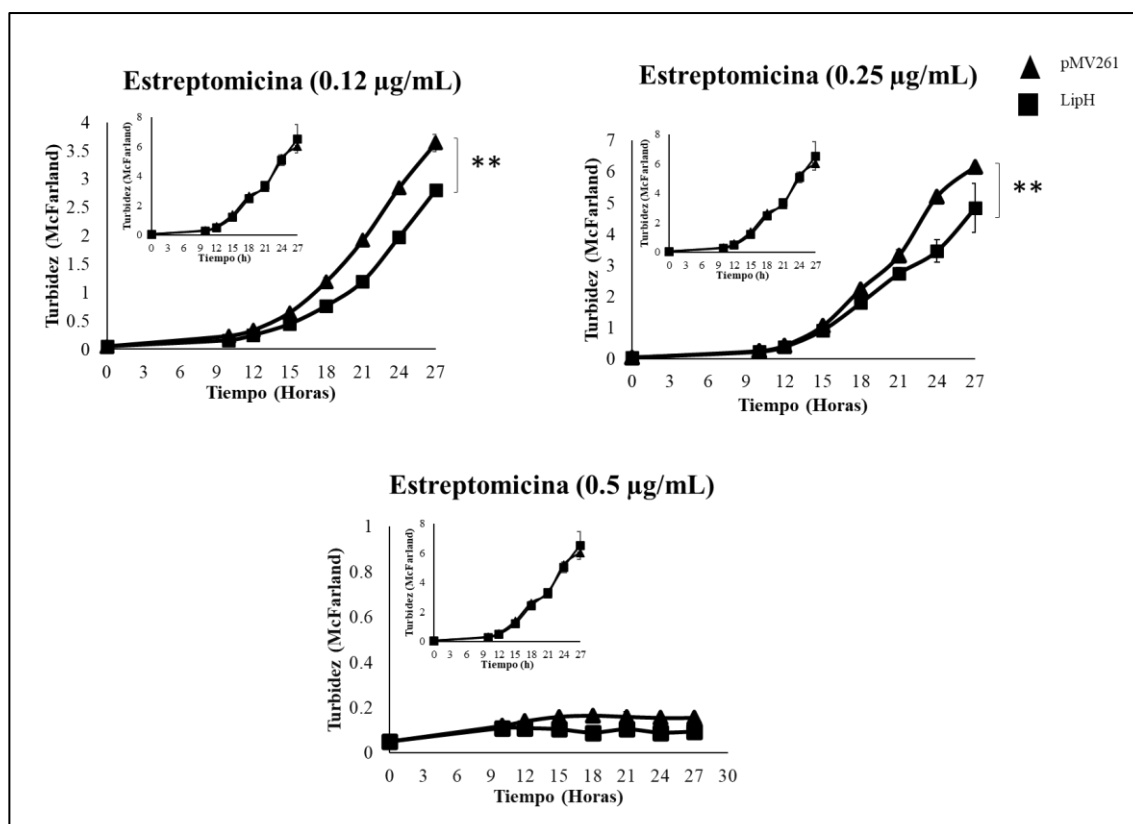


Figura 48. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH en medio 7H9 conteniendo el fármaco STR. El ensayo se realizó en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de STR. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por duplicado mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

7.4.2.3 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipU en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis* mediante cinéticas de crecimiento

Se realizaron cinéticas de crecimiento para medir la sensibilidad a los fármacos RIF e INH en *M. smegmatis* sobreexpresando la lipasa LipU y se observó un menor crecimiento de ésta al utilizar la concentración de 8.0 µg/mL de INH, observándose una mayor sensibilidad que la cepa control, esto con una diferencia significativa; sin embargo, en la cinética de crecimiento utilizando unidades de McFarland para medir la turbidez no se observó este cambio (Figura 49). Interesantemente, en la concentración de 16.0 µg/mL de INH se observó una mayor resistencia de la transformante sobreexpresando LipU en el ensayo realizado por turbidez usando unidades de McFarland, no obstante, al realizarse la

cinética midiendo densidad óptica no se observó un cambio. Para el fármaco RIF a las concentraciones de 0.8 y 1.6 $\mu\text{g/mL}$, se observó este mismo comportamiento (Anexo 15) En la concentración de 3.12 $\mu\text{g/mL}$ así como a la concentración de 32.0 $\mu\text{g/mL}$ de INH no se observó un cambio en el crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipU (Anexo 15 y 16).

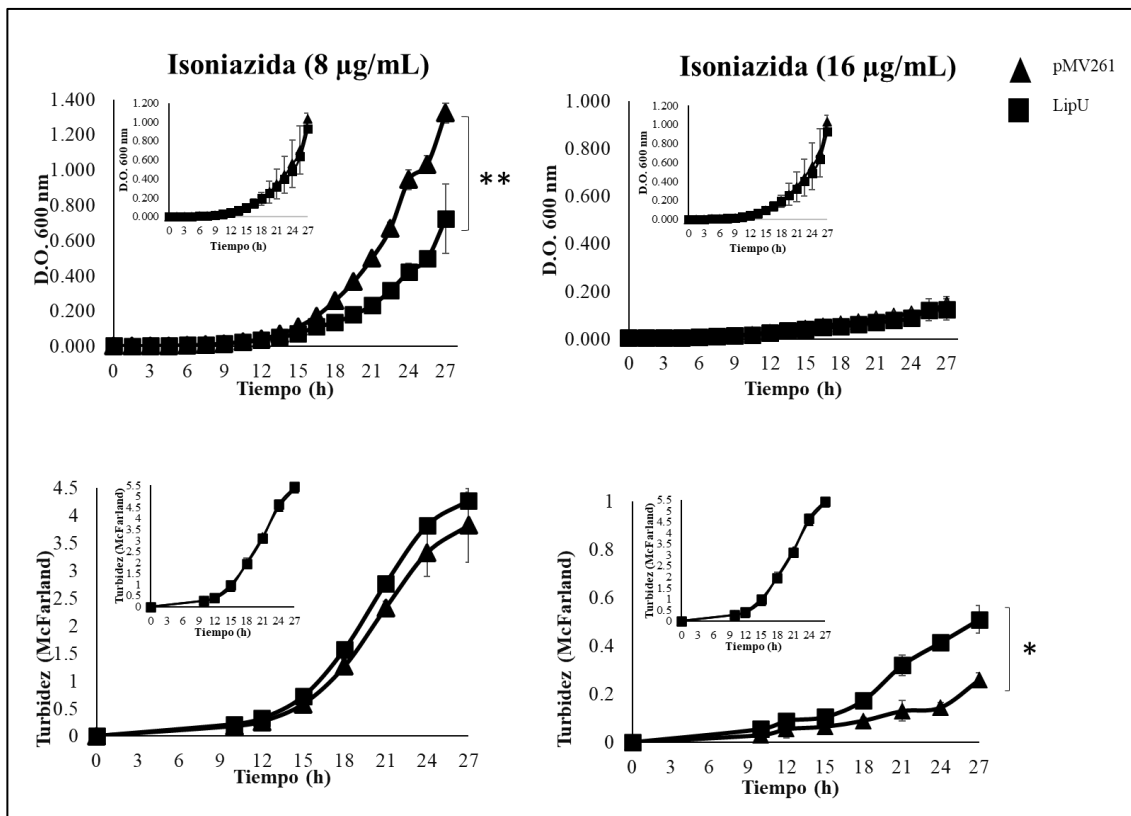


Figura 49. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipU en medio 7H9 conteniendo el fármaco INH. Realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina más las concentraciones indicadas de INH. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado duplicado y triplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

7.4.2.4 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa MSMEI_6226 en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis* mediante cinéticas de crecimiento

Al sobreexpresar MSMEI_6226 en *M. smegmatis*, se observó un mayor crecimiento en las cinéticas utilizando una concentración de 1.6 µg/mL y 3.12 de µg/mL RIF, mostrando una diferencia significativa indicando una mayor resistencia a dicho fármaco (Figura 50 y figura 51). Cuando la transformante sobreexpresando MSMEI_6226 se creció con el fármaco INH se observó también un incremento en la resistencia a este fármaco para la concentración de 16.0 µg/mL en el ensayo de turbidez mediante McFarland. Sin embargo, en el ensayo por densidad óptica no se observó un cambio (Figura 45). En la concentración de 0.8 µg/mL de RIF se observó una mayor sensibilidad, cambios que van desde 0.04 hasta 0.2 de D.O. aproximadamente. Para el fármaco INH a las concentraciones de 8.0 y 32.0 µg/mL no se observaron cambios en el crecimiento bacteriano (Anexo 17 y 18).

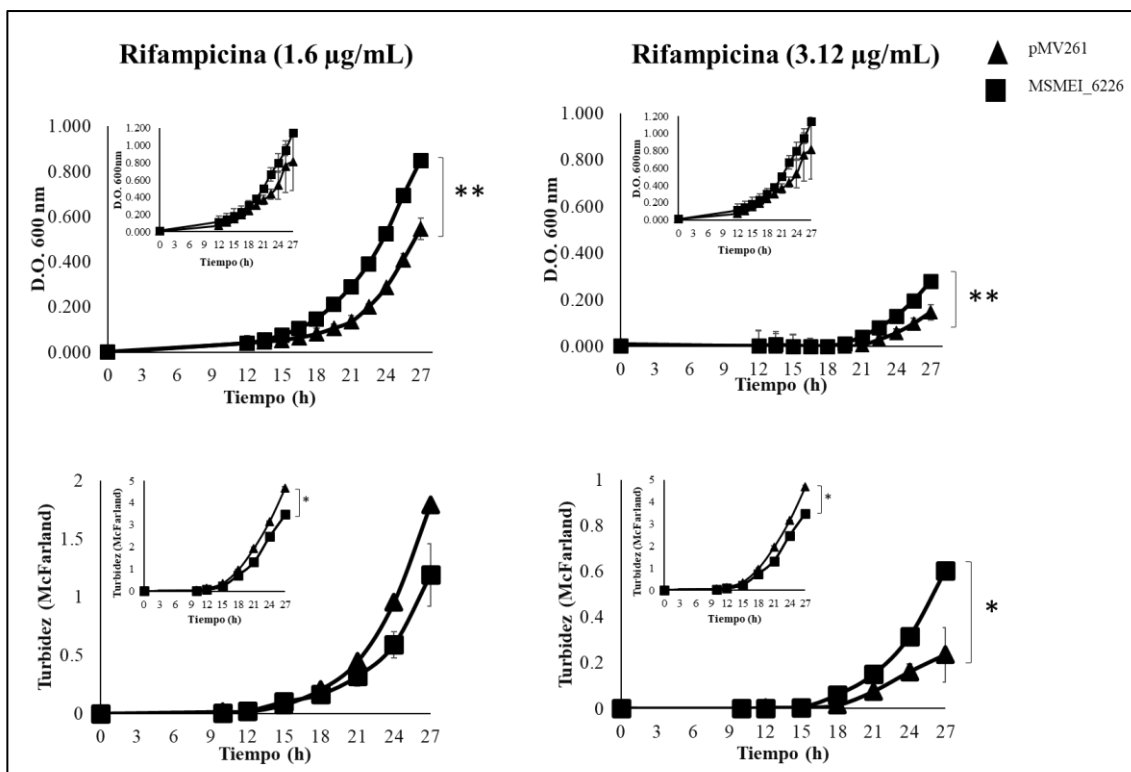


Figura 50. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando MSMEI_6226 en medio 7H9 conteniendo el fármaco RIF. El ensayo se realizó en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de RIF. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado duplicado y triplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

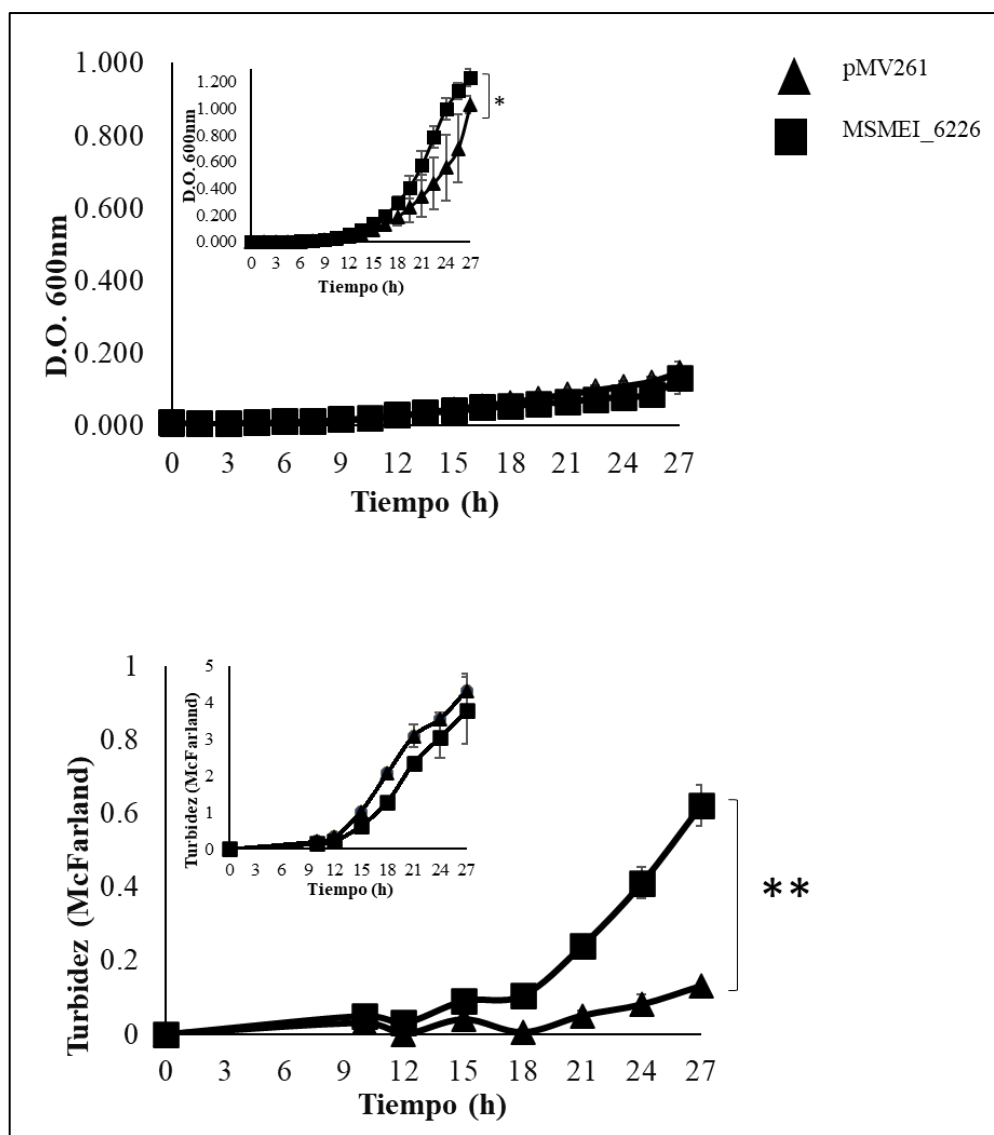


Figura 51. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando MSMEI_6226 en medio 7H9 conteniendo el fármaco INH. El ensayo se realizó en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más la concentración de 16 µg/mL de INH. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado duplicado y triplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

7.4.2.5 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la lipasa LipH en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis* mediante unidades formadoras de colonias

Debido a los resultados variables obtenidos en las cinéticas de crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH utilizando ambos métodos de medición (D.O. y McFarland) decidimos evaluar su crecimiento mediante el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) utilizando las concentraciones de 0.8 µg/mL de RIF y 8 µg/mL de INH en donde se observó una mayor sensibilidad al sobreexpresarse esta lipasa mediante la técnica de densidad óptica. Para el conteo de unidades formadoras de colonias, la transformante se creció hasta su fase exponencial (22.5 h) en medio líquido conteniendo los fármacos a las concentraciones indicadas y posteriormente se sembró en medio sólido (7H10 suplementado con OADC y conteniendo el fármaco de selección) Se identificó que el crecimiento de la cepa en el medio control (medio en ausencia de fármacos) como en el medio conteniendo el fármaco INH no se observó un cambio significativo en el número de unidades formadoras de colonias (Figura 52). Sin embargo, se observó una disminución en la cantidad de unidades formadoras de colonias obtenidas de la transformante sobreexpresando LipH en el cultivo en presencia de RIF, mostrándose una mayor sensibilidad a este fármaco (Figura 53).

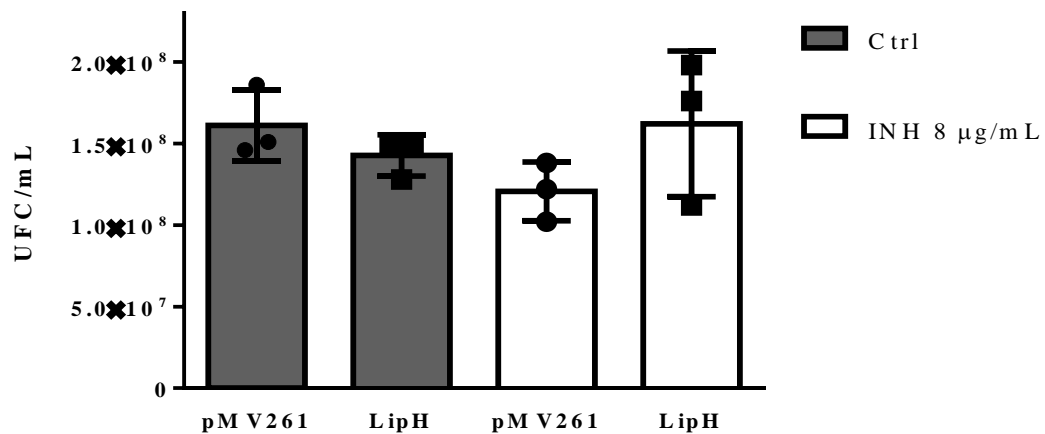


Figura 52. Unidades formadoras de colonia de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH en cultivos conteniendo el fármaco INH. Ctrl, control de crecimiento medio 7H9 suplementado con ADC y conteniendo 20 µg/mL de kanamicina; INH 8, Medio 7H9 suplementado con ADC y conteniendo 20 µg/mL de kanamicina más 8 µg/mL de isoniazida. Unidades formadoras de colonia detectadas en medio sólido 7H10 suplementado con OADC 10%. Se muestra la desviación estándar del triplicado del ensayo en donde no se observaron diferencias significativas.

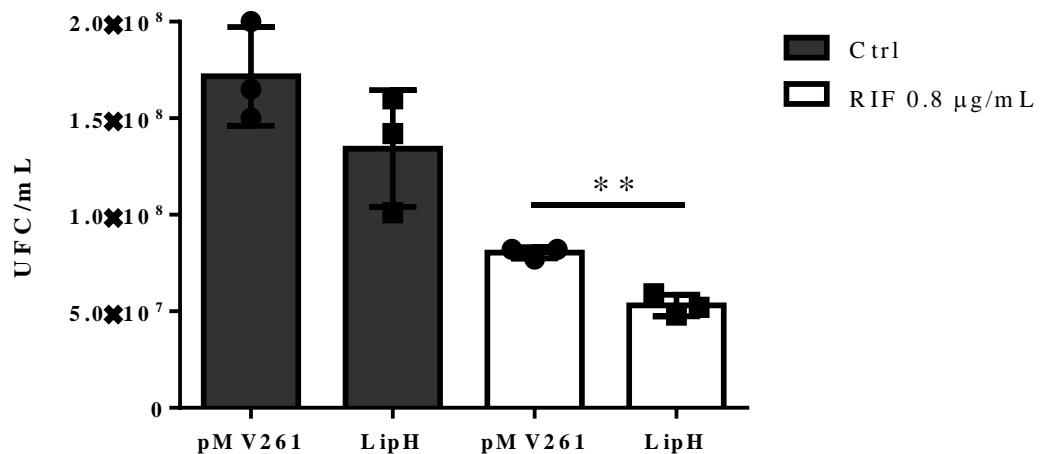


Figura 53. Unidades formadoras de colonia de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH en cultivos conteniendo el fármaco RIF. Ctrl, control de crecimiento medio 7H9 suplementado con ADC y conteniendo 20 µg/mL de kanamicina; INH 8, Medio 7H9 suplementado con ADC y conteniendo 20 µg/mL de kanamicina más 0.8 µg/mL de rifampicina. Unidades formadoras de colonia detectadas en medio sólido 7H10 suplementado con OADC 10%. Se muestra la desviación estándar del triplicado del ensayo. **, $P < 0.01$.

7.4 Evaluación de la morfología colonial de *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226.

Previamente se ha reportado que cambios en la expresión de las lipasas LipX, LipG y Rv038c provocan un cambio en la morfología colonial en micobacterias (Dhouib *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2016, Santucci *et al.*, 2018). Por lo anterior, se evaluó si las transformantes sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 utilizadas en este estudio presentaban un cambio en la morfología colonial (Figuras 54 y 56). Para tal finalidad, se evaluó el tamaño de la colonia y ancho de borde de las bacterias crecidas en medio sólido (Figuras 55 y 57). Se identificó un cambio en el ancho de borde de las colonias de la transformante sobreexpresando LipH mientras que, para esta misma, no se observó diferencia en el tamaño de las colonias (Figura 57). No se observaron cambios en la morfología colonial en *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipU y MSMEI_6226, (Figuras 55 y 57).

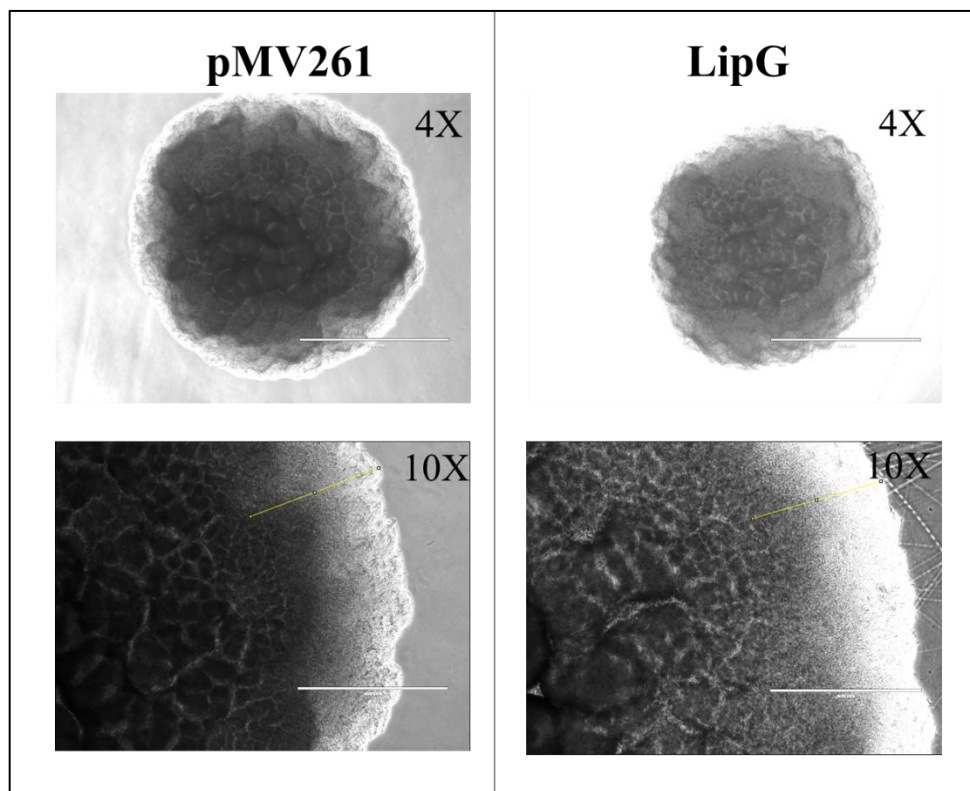


Figura 54. Morfología colonial de *M. smegmatis* sobreexpresando LipG. Colonias observadas al día 3, crecidas en medio sólido 7H9 suplementado con 10% de OADC. Fotografías tomadas con el microscopio EVOS cell imaging systems, objetivo de 4X y 10X.

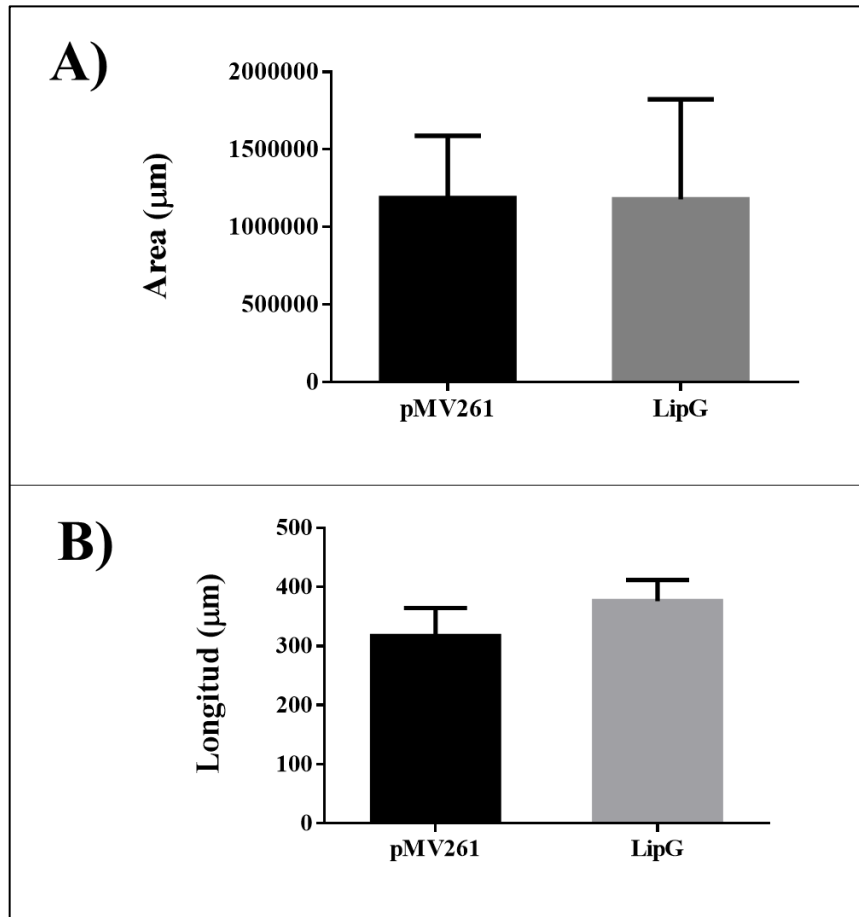


Figura 55. Análisis cuantitativo de la morfología colonial de *M. smegmatis* sobreexpresando LipG. Análisis realizado mediante ImageJ tomando 10 colonias para evaluar tamaño y 3 colonias para ancho colonial. ***, $P < 0.01$.

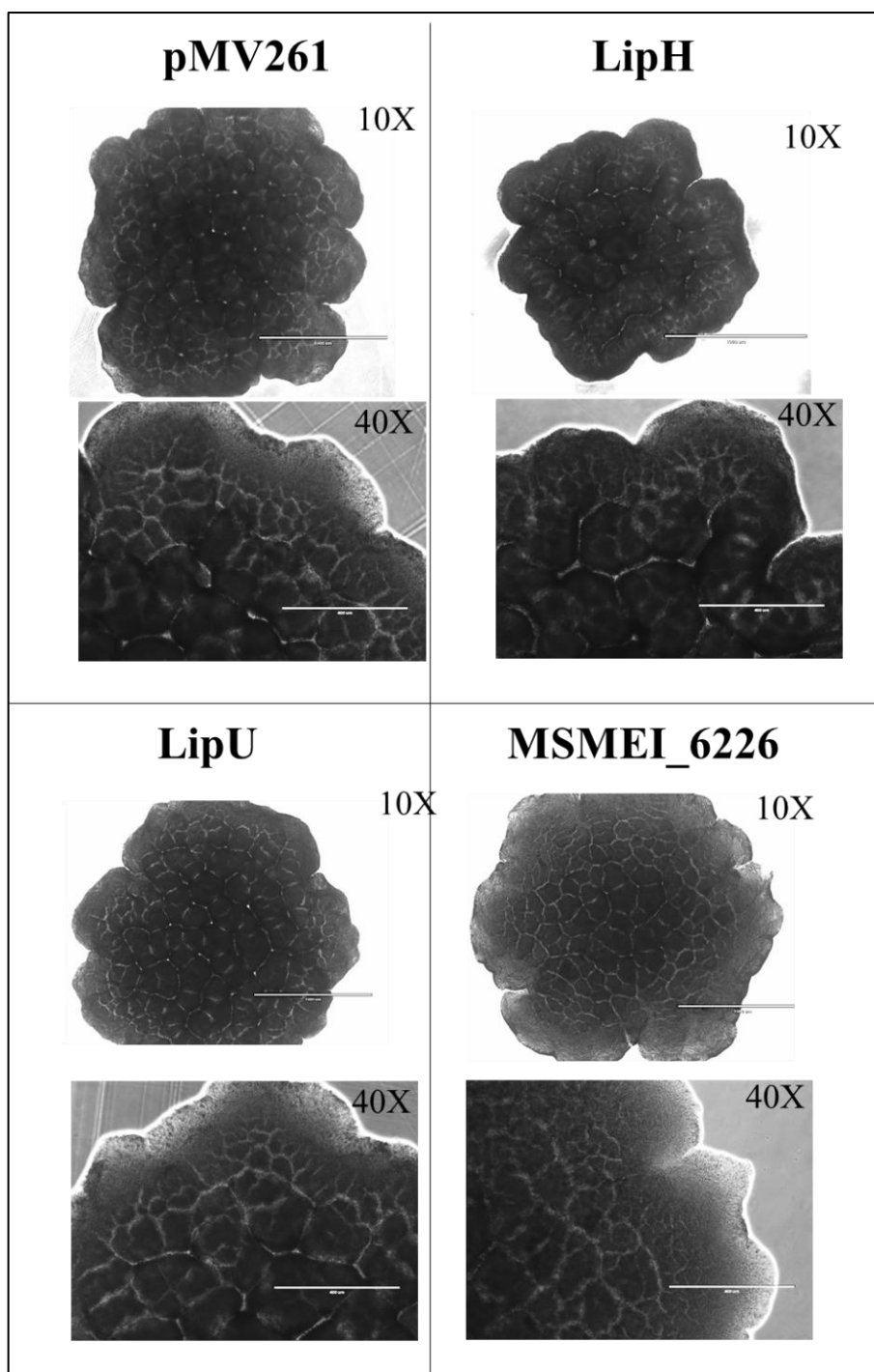


Figura 56. Morfología colonial de las transformantes de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH, LipU y MSMEI_6226. Colonias observadas al día 3, crecidas en medio sólido 7H9 suplementado con 10% de OADC. Fotografías tomadas con el microscopio EVOS cell imaging systems, objetivo de 4X y 10X.

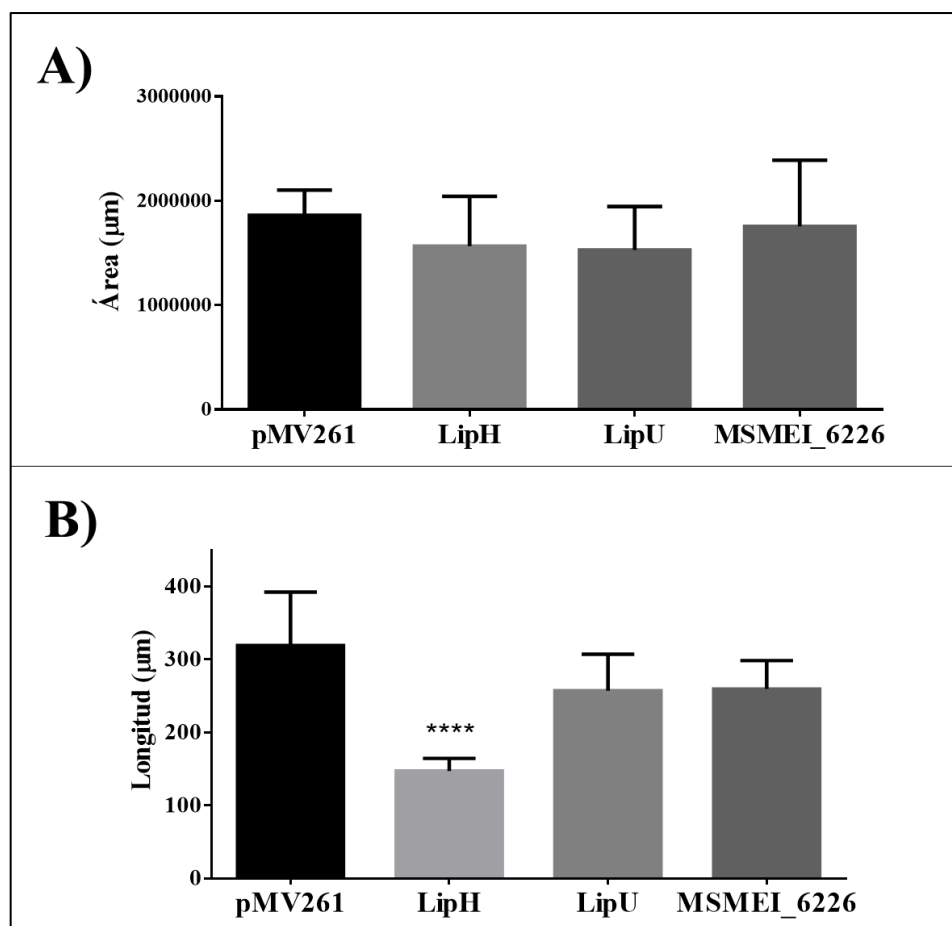


Figura 57. Análisis cuantitativo de la morfología colonial de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH, LipU y MSMEI_6226. Análisis realizado mediante ImageJ tomando 10 colonias para evaluar tamaño y 3 colonias para ancho colonial. ***, $P < 0.01$.

8. DISCUSIÓN

La pared celular de la micobacteria juega un papel clave en la resistencia intrínseca a antibióticos, así como, en la virulencia (Maitra *et al.*, 2019). Se conoce que las lipasas están involucradas en la formación de la pared micobacteriana dado que son biocatalizadores esenciales para la hidrólisis de esteroides, han sido estudiadas por su inmunogenicidad, así como por su papel en la virulencia y supervivencia de la bacteria, considerándose importantes en todo su ciclo de vida, debido a lo cual se consideran claves para el desarrollo de nuevos fármacos pudiendo utilizarse blancos terapéuticos y biomarcadores (Dedieu *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, en el presente trabajo se decidió estudiar la participación de las lipasas en la farmacorresistencia.

Dentro de las construcciones realizadas observamos que la lipasa MSMEI_6226 mostraba una mutación dentro de la región codificante en la posición 738, presentando cambio de guanina a adenina, este error podría deberse más que a una mutación de dicho gen proveniente de la cepa *M. smegmatis* mc²155 a un error de la *Taq* DNA polimerasa, ya que se sabe que esta enzima presenta una tasa de error de 1×10^{-6} , esto es 1 mutación cada 1,000,000 de pares de bases incorporadas (McInerney *et al.*, 2014). Sin embargo, considerando que este cambio corresponde a una mutación silente donde no se sustituye el aminoácido codificante, se decidió continuar trabajando con esta construcción.

La expresión heteróloga de genes en *M. smegmatis* ha sido utilizada para evaluar la posible función de estos en *M. tuberculosis*, además esta bacteria se ha utilizado para la evaluación de potenciales fármacos contra tuberculosis (Chaturvedi *et al.*, 2007; Lelovic *et al.*, 2020; Reytrat y Kahn, 2001). En el presente proyecto se utilizó *M. smegmatis* y el vector pMV261, el cual presenta un promotor constitutivo para micobacterias, lo anterior para sobreexpresar las lipasas y evaluar un posible efecto en farmacorresistencia. En los resultados correspondientes a la sobreexpresión, se obtuvieron niveles de que van desde las 140 hasta las 1,000 veces más para las lipasas evaluadas (LipG, LipH, LipU y MSMEI6226) (Stover *et al.*, 1991; C. Wang *et al.*, 2012).

Para evaluar la resistencia o sensibilidad a fármacos en este estudio se utilizó la técnica de microdilución en placa usando el compuesto resazurina, esta técnica ha sido

utilizada para la evaluación de fármacos en *Mycobacterium* por diversos autores (Agrawal *et al.*, 2015; Andrews, 2001), siendo esta una técnica rápida y económica para la evaluación de resistencias a los fármacos, así como una prueba ampliamente utilizada para el desarrollo de nuevos antimicobacterianos (Agrawal *et al.*, 2015; Horne *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2003; Rakhmawatie *et al.*, 2019). A pesar de esto, en este estudio observamos variabilidad en los ensayos. Se ha reportado que otras técnicas colorimétricas como lo es el ensayo de microdilución en placa usando el compuesto alamar azul (MABA por sus siglas en inglés) presentan una variabilidad entre ensayos mostrando cambios de entre una y dos diluciones (Leonard *et al.*, 2008), por lo que se recomiendan este tipo de técnicas para la determinación de cepas susceptibles o resistentes más que para la determinación de una CMI específica (Leonard *et al.*, 2008). Para fines de este estudio, dicho ensayo nos proporcionó información sobre la resistencia o susceptibilidad de las transformantes evaluadas, las cuales posteriormente fueron confirmadas con las cinéticas de crecimiento a concentraciones específicas.

Se realizaron cinéticas de crecimiento analizando turbidez por densidad óptica y por McFarland, en el cual se observó diferencias en el crecimiento de las lipasas en los controles (crecimiento solamente con fármaco de selección). Sin embargo, al realizar análisis posteriores identificamos que en la mayoría de los casos estos cambios en el crecimiento de las lipasas no afectaban al ensayo de determinación de sensibilidad o resistencia a los fármacos. identificándose una mayor sensibilidad a los fármacos RIF e INH al sobreexpresar la lipasa LipG en *M. smegmatis*, este cambio se observó por ambas metodologías. Estos resultados complementan lo observado por Santucci *et al.*, 2018 los cuales identificaron un aumento en la resistencia a estos fármacos relacionada con la inhibición de dicha lipasa, por lo que nuestros resultados confirman la participación de LipG en la resistencia a fármacos. De igual manera, en este trabajo se identificó que la sobreexpresión de la lipasa LipH aumenta la sensibilidad a los fármacos RIF y STR. Actualmente se desconoce la función biológica de esta proteína; sin embargo, LipH ha sido caracterizada en *M. tuberculosis* donde se ha evidenciado que hidroliza sustratos de cadenas cortas y se ha propuesto que participa en la detoxificación celular (Canaan *et al.*, 2004), por lo que este sería el primer reporte de dicha lipasa relacionado en la farmacorresistencia de micobacterias. Consistentemente con lo observado, otras lipasas

de la familia Lip como LipX han sido asociadas a la resistencia a fármacos, ya que al sobreexpresarse en *M. smegmatis* confiere resistencia a los fármacos RIF, INH y ETB (Singh *et al.*, 2016). Otra lipasa relacionada con la farmacorresistencia, estudiada por nuestro grupo de investigación, ha sido LipF, la cual incrementó la sensibilidad a los fármacos RIF y STR cuando se sobreexpresó en *M. smegmatis* (Arriaga-Guerrero *et al.*, 2020).

En este estudio, además fueron evaluadas las lipasas LipU y MSMEI_6226 en la farmacorresistencia de *M. smegmatis*, para los cuales identificamos variabilidad en los resultados de cinéticas de crecimiento utilizando dos diferentes técnicas (McFarland y Densidad óptica). Se identificó una mayor sensibilidad al fármaco INH en la cinética evaluada por densidad óptica cuando se sobreexpresó la lipasa LipU; sin embargo, en la cinética de crecimiento evaluada mediante unidades de McFarland no fue posible observar dicho cambio. De igual manera con la sobreexpresión de MSMEI_6226 observamos un aumento en la resistencia al fármaco RIF; no obstante, este fenómeno no se replica entre las técnicas utilizadas. En resultados obtenidos con *M. tuberculosis*, estas técnicas se han encontrado altamente correlacionadas (Penuelas-Urquides, Villarreal-Trevino, *et al.*, 2013) pero en nuestro estudio no identificamos resultados consistentes para las lipasas LipU y MSMEI_6226. A pesar de que ambas técnicas (D.O. y McF) se basan en la medición de turbidez, presentan fundamentos diferentes. En el caso de la medición de unidades de McF usando un nefelómetro, esta medición se basa en la cuantificación de la densidad de luz dispersada en un ángulo de 90 grados; este diseño disminuye la precisión del nefelómetro a medida que aumenta la turbidez de la muestra (Acebo-Gonzalez y Hernandez-Garcia, 2012) Respecto a la medición de D.O., ésta se realiza usando un turbidímetro el cual mide la absorbancia de la muestra en estudio, la luz pasa a través de la muestra en un ángulo de 180 grados y la luz absorbida es directamente proporcional a la cantidad de bacterias en suspensión; sin embargo, esta técnica no puede diferenciar entre bacterias viables o no viables (Acebo-Gonzalez y Hernandez-Garcia, 2012). Por lo tanto, dichas diferencias podrían ser un factor para considerar en las variabilidades observadas. Debido a lo anterior, para poder correlacionar a las lipasas LipU y MSMEI_6226 con la farmacorresistencia de *Mycobacterium* son necesarios más estudios,

como por ejemplo determinación de unidades formadoras de colonias en presencia de los fármacos.

En algunos casos, cambios en la expresión de lipasas se han asociado con cambios en la morfología colonial y así como en la composición de la pared celular. Un ejemplo es la lipasa Rv0183, la cual al expresarse en *M. smegmatis* ocasiona una modificación en la morfología colonial, observándose colonias brillosas de bordes regulares y redondas, una morfología atípica a la esperada para una colonia de micobacterias, las cuales regularmente son colonias secas, con bordes irregulares, opaca con la aparición de una formación tipo *cord factor* (Dhouib *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha reportado que al inhibir LipG se observa un cambio menos evidente en la composición colonial, dejando pasar más la luz a través de la colonia (Santucci *et al.*, 2018). En este estudio se observó un cambio relacionado a la morfología colonial cuando sobreexpresamos LipH en *M. smegmatis*, en donde se identificaron colonias con un borde más pequeño comparado con el control pMV261. Dicho efecto en la modificación de la estructura colonial se puede deber a modificaciones en la pared celular. Se sabe que la pared celular es un mecanismo de resistencia intrínseca, que permite a la micobacteria resistir a agentes externos, como es el caso de los antibióticos β -lactámicos en los cuales impide su paso al interior de la célula provocando una resistencia hasta 100 veces mayor que otras bacterias (Nguyen, 2016). Se ha identificado que las micobacterias pueden modificar la composición de su pared celular cuando estas se encuentran expuestas al fármaco, como es el caso del estudio de Sebastian *et al.* (2019) (Sebastian *et al.*, 2019), en donde identificaron que micobacterias persistentes a RIF presentaban una modificación en la composición de su pared celular, la cual presentaba un engrosamiento causado por un aumento de carbohidratos en la membrana externa. Al sobreexpresar o inhibir lipasas, se ha observado que se ocasiona una modificación en la composición de la pared celular a nivel de la micomembrana; este cambio es ocasionado principalmente por un aumento de los glucopeptidolípidos y trehalosas dimicolatos (Santucci *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2016). Por lo anterior, podemos sugerir que las lipasas LipG y LipH podrían estar modificando esta composición de la pared, ocasionando de esta manera el aumento en la sensibilidad a los fármacos RIF, INH y STR; sin embargo, son necesarios más estudios como

cromatografía líquida de alta eficacia, cromatografía en capa fina e incluso microscopia electrónica para comprobar dicho fenómeno.

Este estudio se realizó en una cepa modelo de *M. tuberculosis*, por lo que sería importante evaluar si la expresión de estas lipasas también modifica la farmacorresistencia en *M. tuberculosis*. No obstante, los resultados presentados en este estudio representan uno de los primeros reportes de las lipasas en farmacorresistencia, siendo el primer reporte de LipH involucrado en este fenómeno.

8. CONCLUSIONES

- Se realizaron las transformantes para la inhibición de LipH usando CRISPRi.
- La sobreexpresión de LipG aumentó la sensibilidad a los fármacos RIF e INH en *M. smegmatis*.
- La sobreexpresión de LipH en *M. smegmatis* aumentó la sensibilidad a los fármacos RIF, INH y STR
- La sobreexpresión de LipH en *M. smegmatis* modificó la morfología colonial
- La sobreexpresión de MSMEI_6226 en *M. smegmatis* aumentó la resistencia al fármaco RIF.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar las modificaciones en la pared celular de las micobacterias al sobreexpresar o inhibir a las lipasas LipG y LipH.
- Evaluar la inhibición de las lipasas LipH, LipU, MSMEI_6226 en *M. smegmatis* y su efecto en la resistencia a fármacos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acebo-Gonzalez, D., & Hernandez-Garcia, A. T. (2012). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC*, 44, 1-18.
- Agrawal, P., Miryala, S., & Varshney, U. (2015). Use of Mycobacterium smegmatis deficient in ADP-ribosyltransferase as surrogate for Mycobacterium tuberculosis in drug testing and mutation analysis. *PLoS One*, 10(4), e0122076. doi:10.1371/journal.pone.0122076
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5-16.
- Arriaga-Guerrero, A. L., Hernandez-Luna, C. E., Rigal-Leal, J., Robles-Gonzalez, R. J., Gonzalez-Escalante, L. A., Silva-Ramirez, B., . . . Penuelas-Urquides, K. (2020). LipF increases rifampicin and streptomycin sensitivity in a Mycobacterium tuberculosis surrogate. *BMC Microbiol*, 20(1), 132. doi:10.1186/s12866-020-01802-x
- Becerril-Montes, P., Said-Fernandez, S., Luna-Herrera, J., Caballero-Olin, G., Enciso-Moreno, J. A., Martinez-Rodriguez, H. G., . . . Molina-Salinas, G. M. (2013). A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(2), 160-166. doi:10.1590/0074-0276108022013006
- Beste, D. J., Espasa, M., Bonde, B., Kierzek, A. M., Stewart, G. R., & McFadden, J. (2009). The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. *PLoS One*, 4(4), e5349. doi:10.1371/journal.pone.0005349

BioCyc.org. (2021). The BioCyc Metabolic Network Explorer.

Brock. (2005). *Biología de los microorganismos*

(E. P. P. Hall Ed. Vol. 10ª Edición): Editorial Pearson/Prentice Hall.

Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., . . . van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960-964. doi:10.1126/science.1159689

Brust, B., Lecoufle, M., Tuaillon, E., Dedieu, L., Canaan, S., Valverde, V., & Kremer, L. (2011). Mycobacterium tuberculosis lipolytic enzymes as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis. *PLoS One*, 6(9), e25078. doi:10.1371/journal.pone.0025078

Cambier, C. J., Falkow, S., & Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. *Cell*, 159(7), 1497-1509. doi:10.1016/j.cell.2014.11.024

Canaan, S., Maurin, D., Chahinian, H., Pouilly, B., Durousseau, C., Frassinetti, F., . . . Bourne, Y. (2004). Expression and characterization of the protein Rv1399c from Mycobacterium tuberculosis. A novel carboxyl esterase structurally related to the HSL family. *Eur J Biochem*, 271(19), 3953-3961. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04335.x

CDC. (2021). centers for disease control and prevention. Tuberculosis. Retrieved from <https://www.cdc.gov/tb/>

Chaoui, I., Sabouni, R., Kourout, M., Jordaan, A. M., Lahlou, O., Elouad, R., . . . El Mzibri, M. (2009). Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance

in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *J Infect Dev Ctries*, 3(4), 278-284. doi:10.3855/jidc.125

Chaturvedi, V., Dwivedi, N., Tripathi, R. P., & Sinha, S. (2007). Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Appl Microbiol*, 53(6), 333-337. doi:10.2323/jgam.53.333

Chen, L., Dang, G., Deng, X., Cao, J., Yu, S., Wu, D., . . . Liu, S. (2014). Characterization of a novel exported esterase Rv3036c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif*, 104, 50-56. doi:10.1016/j.pep.2014.09.003

Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., . . . Daffe, M. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep*, 7(1), 12807. doi:10.1038/s41598-017-12718-4

Choudhary, E., Thakur, P., Pareek, M., & Agarwal, N. (2015). Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nat Commun*, 6, 6267. doi:10.1038/ncomms7267

Coll, P. (2003). [Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21(6), 299-307; quiz 308, 326. doi:10.1016/s0213-005x(03)72945-0

Dedieu, L., Serveau-Avesque, C., Kremer, L., & Canaan, S. (2013). Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research. *Biochimie*, 95(1), 66-73. doi:10.1016/j.biochi.2012.07.008

- Dhouib, R., Laval, F., Carriere, F., Daffe, M., & Canaan, S. (2010). A monoacylglycerol lipase from *Mycobacterium smegmatis* Involved in bacterial cell interaction. *J Bacteriol*, 192(18), 4776-4785. doi:10.1128/JB.00261-10
- Drain, P. K., Bajema, K. L., Dowdy, D., Dheda, K., Naidoo, K., Schumacher, S. G., . . . Sherman, D. R. (2018). Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clin Microbiol Rev*, 31(4). doi:10.1128/CMR.00021-18
- epidemiologica, s. n. d. v. (2021). Boletín epidemiológico nacional. *semana 53*.
- Garza-Velasco, R., Ávila-de Jesús, J., & Perea-Mejía, L. M. (2017). Tuberculosis pulmonar: la epidemia mundial continúa y la enseñanza de este tema resulta crucial y compleja. *Educación Química*, 28(1), 38-43. doi:10.1016/j.eq.2016.09.009
- Goins, C. M., Schreidah, C. M., Dajnowicz, S., & Ronning, D. R. (2018). Structural basis for lipid binding and mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* Rv3802 phospholipase. *J Biol Chem*, 293(4), 1363-1372. doi:10.1074/jbc.RA117.000240
- Gonzalez-Escalante, L., Penuelas-Urquides, K., Said-Fernandez, S., Silva-Ramirez, B., & Bermudez de Leon, M. (2015). Differential expression of putative drug resistance genes in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 362(23), fnv194. doi:10.1093/femsle/fnv194
- Gonzalez, Y. M. J. A., Zaragoza-Contreras, R., Guadarrama-Medina, R., Helguera-Repetto, A. C., Rivera-Gutierrez, S., Cerna-Cortes, J. F., . . . Cox, R. A. (2012). Evaluation of the cell growth of mycobacteria using *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 as a representative species. *J Microbiol*, 50(3), 419-425. doi:10.1007/s12275-012-1556-0

- Guirado, E., Schlesinger, L. S., & Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin Immunopathol*, 35(5), 563-583. doi:10.1007/s00281-013-0388-2
- Gupta, R. S., Lo, B., & Son, J. (2018). Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol*, 9, 67. doi:10.3389/fmicb.2018.00067
- Harrison. (2015). *Harrison principles of internal medicine* (Vol. 18th).
- Hillemann, D., Rusch-Gerdes, S., & Richter, E. (2009). Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 47(6), 1767-1772. doi:10.1128/JCM.00081-09
- Horne, D. J., Pinto, L. M., Arentz, M., Lin, S. Y., Desmond, E., Flores, L. L., . . . Minion, J. (2013). Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. *J Clin Microbiol*, 51(2), 393-401. doi:10.1128/JCM.02724-12
- Kaufmann, S. H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*, 1(1), 20-30. doi:10.1038/35095558
- Kaur, G., Pandey, B., Kumar, A., Garewal, N., Grover, A., & Kaur, J. (2019). Drug targeted virtual screening and molecular dynamics of LipU protein of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *J Biomol Struct Dyn*, 37(5), 1254-1269. doi:10.1080/07391102.2018.1454852

- Koch, A., Mizrahi, V., & Warner, D. F. (2014). The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerg Microbes Infect*, 3(3), e17. doi:10.1038/emi.2014.17
- Lee, J. Y. (2015). Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 78(2), 47-55. doi:10.4046/trd.2015.78.2.47
- Lehmann, & Neumann. (1896). *Mycobacterium*. In *GBIF Backbone Taxonomy*. GBIF Secretariat (2021).
- Lelovic, N., Mitachi, K., Yang, J., Lemieux, M. R., Ji, Y., & Kurosu, M. (2020). Application of *Mycobacterium smegmatis* as a surrogate to evaluate drug leads against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antibiot (Tokyo)*, 73(11), 780-789. doi:10.1038/s41429-020-0320-7
- Leonard, B., Coronel, J., Siedner, M., Grandjean, L., Caviedes, L., Navarro, P., . . . Moore, D. A. (2008). Inter- and intra-assay reproducibility of microplate Alamar blue assay results for isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, ciprofloxacin, and capreomycin drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3526-3529. doi:10.1128/JCM.02083-07
- Lerner, T. R., Borel, S., & Gutierrez, M. G. (2015). The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol*, 17(9), 1277-1285. doi:10.1111/cmi.12480
- Leung, A. N. (1999). Pulmonary tuberculosis: The essentials. *Radiology*, 210, 307-322.
- Li, C., Li, Q., Zhang, Y., Gong, Z., Ren, S., Li, P., & Xie, J. (2017). Characterization and function of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Lipase Rv1076 (LipU). *Microbiol Res*, 196, 7-16. doi:10.1016/j.micres.2016.12.005

- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., . . . Chesnut, J. D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*, 208, 44-53. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.04.024
- Liu, J., & Nikaido, H. (1999). A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7), 4011-4016. doi:10.1073/pnas.96.7.4011
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- LoBue, P. (2009). Extensively drug-resistant tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis*, 22(2), 167-173. doi:10.1097/qco.0b013e3283229fab
- Maeurer, M., & Zumla, A. (2014). The host battles drug-resistant tuberculosis. *Sci Transl Med*, 6(263), 263fs247. doi:10.1126/scitranslmed.aaa1274
- Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L. T., Vollmer, W., Keep, N. H., & Bhakta, S. (2019). Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev*, 43(5), 548-575. doi:10.1093/femsre/fuz016
- Martin, A., Camacho, M., Portaels, F., & Palomino, J. C. (2003). Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(11), 3616-3619. doi:10.1128/aac.47.11.3616-3619.2003

- McInerney, P., Adams, P., & Hadi, M. Z. (2014). Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol Biol Int*, 2014, 287430. doi:10.1155/2014/287430
- Meniche, X., Labarre, C., de Sousa-d'Auria, C., Huc, E., Laval, F., Tropis, M., . . . Houssin, C. (2009). Identification of a stress-induced factor of *Corynebacterineae* that is involved in the regulation of the outer membrane lipid composition. *J Bacteriol*, 191(23), 7323-7332. doi:10.1128/JB.01042-09
- Muttucumaru, D. G., & Parish, T. (2004). The molecular biology of recombination in *Mycobacteria*: what do we know and how can we use it? *Curr Issues Mol Biol*, 6(2), 145-157.
- Nguyen, L. (2016). Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch Toxicol*, 90(7), 1585-1604. doi:10.1007/s00204-016-1727-6
- Nguyen, L., & Thompson, C. J. (2006). Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol*, 14(7), 304-312. doi:10.1016/j.tim.2006.05.005
- Nikaido, H. (2001). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol*, 12(3), 215-223. doi:10.1006/scdb.2000.0247
- OMS. (2021). Organización mundial de la salud Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- OMS, G. W. H. O. (2020). *Global tuberculosis report 2020*. (Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO).

).

Parker, S. K., Barkley, R. M., Rino, J. G., & Vasil, M. L. (2009). Mycobacterium tuberculosis Rv3802c encodes a phospholipase/thioesterase and is inhibited by the antimycobacterial agent tetrahydrolipstatin. *PLoS One*, 4(1), e4281. doi:10.1371/journal.pone.0004281

Penuelas-Urquides, K., Gonzalez-Escalante, L., Villarreal-Trevino, L., Silva-Ramirez, B., Gutierrez-Fuentes, D. J., Mojica-Espinosa, R., . . . Said-Fernandez, S. (2013). Comparison of gene expression profiles between pansensitive and multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *Curr Microbiol*, 67(3), 362-371. doi:10.1007/s00284-013-0376-8

Penuelas-Urquides, K., Villarreal-Trevino, L., Silva-Ramirez, B., Rivadeneyra-Espinoza, L., Said-Fernandez, S., & de Leon, M. B. (2013). Measuring of Mycobacterium tuberculosis growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units. *Braz J Microbiol*, 44(1), 287-289. doi:10.1590/S1517-83822013000100042

Rabahi, M. F., Silva Junior, J., Ferreira, A. C. G., Tannus-Silva, D. G. S., & Conde, M. B. (2017). Tuberculosis treatment. *J Bras Pneumol*, 43(6), 472-486. doi:10.1590/S1806-37562016000000388

Rakhmawatie, M. D., Wibawa, T., Lisdiyanti, P., Pratiwi, W. R., & Mustofa. (2019). Evaluation of crystal violet decolorization assay and resazurin microplate assay for antimycobacterial screening. *Heliyon*, 5(8), e02263. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02263

- Rattan, A., Kalia, A., & Ahmad, N. (1998). Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis*, 4(2), 195-209. doi:10.3201/eid0402.980207
- Rayasam, G. V., & Balganes, T. S. (2015). Exploring the potential of adjunct therapy in tuberculosis. *Trends Pharmacol Sci*, 36(8), 506-513. doi:10.1016/j.tips.2015.05.005
- Reddy, T. B., Riley, R., Wymore, F., Montgomery, P., DeCaprio, D., Engels, R., . . . Schoolnik, G. K. (2009). TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D499-508. doi:10.1093/nar/gkn652
- Regazzi, M., Carvalho, A. C., Villani, P., & Matteelli, A. (2014). Treatment optimization in patients co-infected with HIV and *Mycobacterium tuberculosis* infections: focus on drug-drug interactions with rifamycins. *Clin Pharmacokinet*, 53(6), 489-507. doi:10.1007/s40262-014-0144-3
- Rendon, A., Tiberi, S., Scardigli, A., D'Ambrosio, L., Centis, R., Caminero, J. A., & Migliori, G. B. (2016). Classification of drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): evidence and perspectives. *J Thorac Dis*, 8(10), 2666-2671. doi:10.21037/jtd.2016.10.14
- Reyrat, J. M., & Kahn, D. (2001). *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? *Trends Microbiol*, 9(10), 472-474. doi:10.1016/s0966-842x(01)02168-0

- Riley, L. W. (2006). Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest*, 116(6), 1475-1478. doi:10.1172/JCI28734
- Riojas, M. A., McGough, K. J., Rider-Riojas, C. J., Rastogi, N., & Hazbon, M. H. (2018). Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68(1), 324-332. doi:10.1099/ijsem.0.002507
- Rock, J. M., Hopkins, F. F., Chavez, A., Diallo, M., Chase, M. R., Gerrick, E. R., . . . Fortune, S. M. (2017). Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol*, 2, 16274. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.274
- Santucci, P., Point, V., Poncin, I., Guy, A., Crauste, C., Serveau-Avesque, C., . . . Canaan, S. (2018). LipG a bifunctional phospholipase/thioesterase involved in mycobacterial envelope remodeling. *Biosci Rep*, 38(6). doi:10.1042/BSR20181953
- Sebastian, J., Swaminath, S., & Ajitkumar, P. (2019). reduced permeability to rifampicin by capsular thickening as a mechanism of antibiotic persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. *BioRxiv*. doi:10.1101/624569
- Shehzad, A., Rehman, G., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., & Lee, Y. S. (2013). Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis. *Braz J Infect Dis*, 17(1), 74-81. doi:10.1016/j.bjid.2012.10.009

- Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry, C. E., 3rd, . . . Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 333(6049), 1630-1632. doi:10.1126/science.1208813
- Singh, P., Rao, R. N., Reddy, J. R., Prasad, R. B., Kotturu, S. K., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2016). PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence. *Sci Rep*, 6, 21624. doi:10.1038/srep21624
- Srinivas, M., Rajakumari, S., Narayana, Y., Joshi, B., Katoch, V. M., Rajasekharan, R., & Balaji, K. N. (2008). Functional characterization of the phospholipase C activity of Rv3487c and its localization on the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biosci*, 33(2), 221-230. doi:10.1007/s12038-008-0039-2
- Stover, C. K., De la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., . . . Bloom, B. R. (1991). New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 351, 4.
- Sugawara, R. S. N. I. I. (2007). Overview of Anti-Tuberculosis (TB) Drugs and Their Resistance Mechanisms. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 7, 1177-1185.
- Wang, C., Fu, R., Chen, Z., Tan, K., Chen, L., Teng, X., . . . Fan, X. (2012). Immunogenicity and protective efficacy of a novel recombinant BCG strain overexpressing antigens Ag85A and Ag85B. *Clin Dev Immunol*, 2012, 563838. doi:10.1155/2012/563838
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem*, 85, 227-264. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014607

- Zazueta-Beltran, J., Leon-Sicairos, N., Muro-Amador, S., Flores-Gaxiola, A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villasenor, H., & Canizalez-Roman, A. (2011). Increasing drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Sinaloa, Mexico, 1997-2005. *Int J Infect Dis*, 15(4), e272-276. doi:10.1016/j.ijid.2011.01.001
- Zhang, M., Wang, J. D., Li, Z. F., Xie, J., Yang, Y. P., Zhong, Y., & Wang, H. H. (2005). Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif*, 42(1), 59-66. doi:10.1016/j.pep.2005.03.022
- Zhu, M., & Dai, X. (2018). On the intrinsic constraint of bacterial growth rate: *M. tuberculosis*'s view of the protein translation capacity. *Crit Rev Microbiol*, 44(4), 455-464. doi:10.1080/1040841X.2018.1425672

11. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Ana Leticia Arriaga Guerrero

Candidata para el grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: **PARTICIPACIÓN DE LIPASAS EN EL FENÓMENO DE FARMACORRESISTENCIA DE *Mycobacterium tuberculosis***

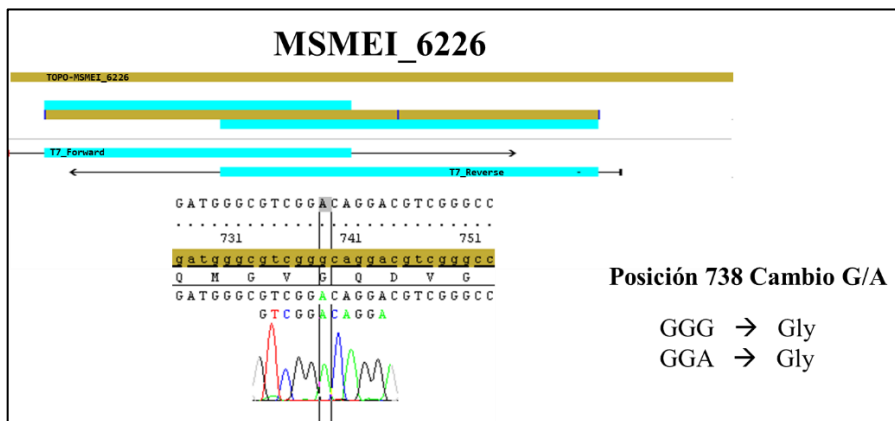
Campo de estudio: Microbiología Molecular

Datos personales: Nacida en Culiacán, Sinaloa el día 09 de febrero de 1991, hija de Luis Fernando Arriaga Ramos y Olga Leticia Guerrero Ahumada.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Sinaloa, grado obtenido Licenciada Química Farmacéutica Bióloga. Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en ciencias con orientación en Microbiología.

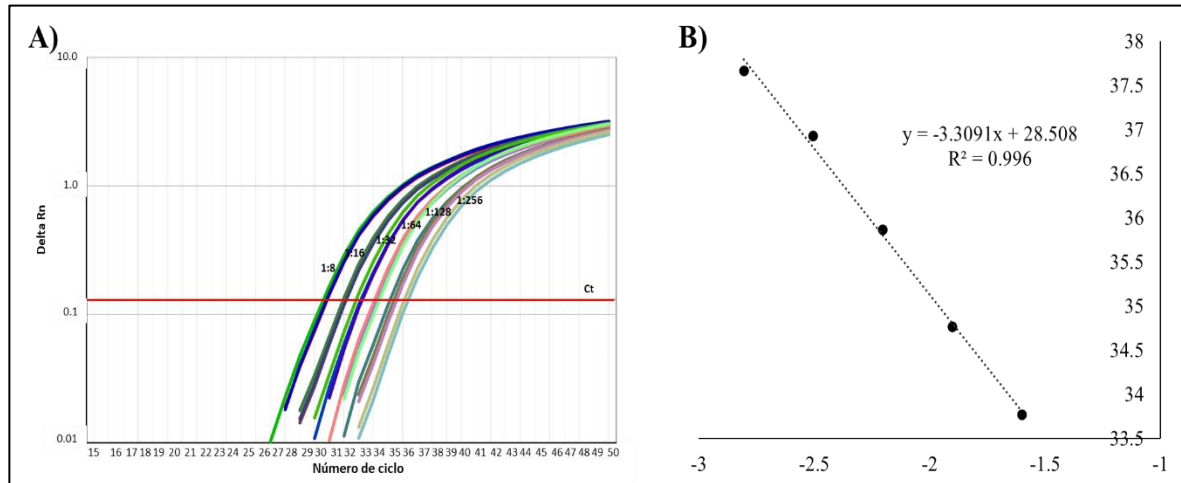
12. ANEXOS

Anexo 1



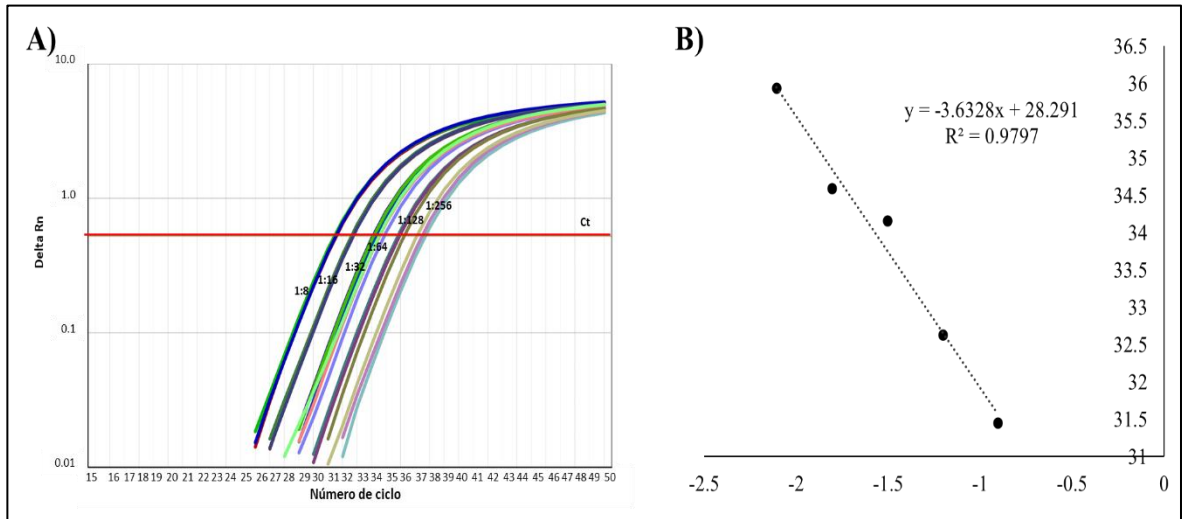
Anexo 1. Mutación silente en la región codificante del gen MSMEI_6226 en *M. smegmatis*. Línea dorada representa la secuencia de referencia, en celeste se muestra la secuencia alineada con la referencia, líneas azules dentro de la región dorada representan mutaciones, en gris se muestra la región que comprende a la secuencia codificante de MSMEI_6226. Datos analizados en el programa CLC sequence viewer 7. Se presenta el cambio de base en la posición 738 (G/A) el cual representa una mutación silente, pues es la tercera posición del codón que codifica para el mismo aminoácido Glicina (Gly).

Anexo 2



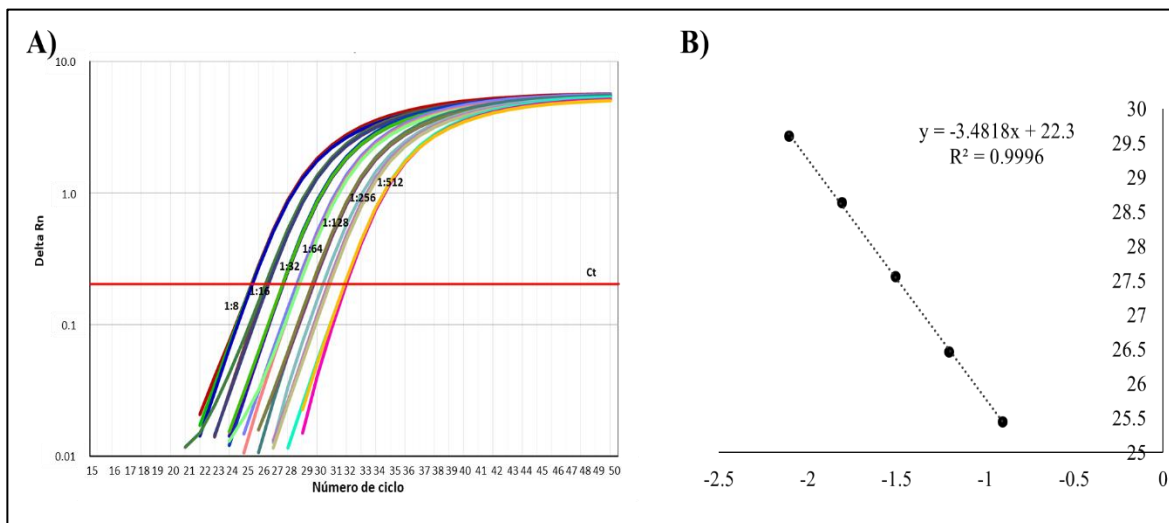
Anexo 2. Estandarización del ensayo la amplificación del gen *lipG*. A) Rango dinámico de amplificación para el gen *lipG* de *M. smegmatis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA de 1:8 a 1:512. Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de la fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *lipG* (Marcada con el fluoróforo FAM) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (Fluoróforo ROX) menos la línea basal. La línea horizontal representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para análisis cuantitativos. B) Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia del gen *lipG* de *M. smegmatis*. Se muestra el valor de Ct (ciclo umbral) con respecto a la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente (y) y el valor predictivo de confianza (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA (R^2 cercana a 1), respectivamente.

Anexo 3



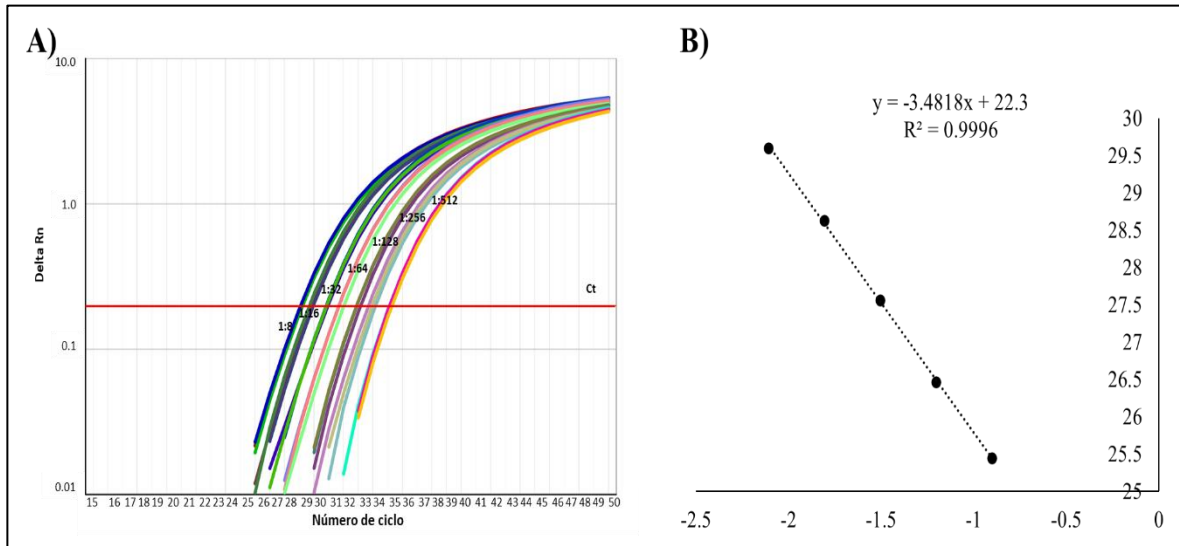
Anexo 3. Estandarización del ensayo para la amplificación del gen *lipH*. A) Rango dinámico de amplificación para el gen *lipH* de *M. smegmatis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA de 1:8 a 1:512. Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de la fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *lipH* (Marcada con el fluoróforo FAM) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (Fluoróforo ROX) menos la línea basal. La línea horizontal representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para análisis cuantitativos. B) Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia del gen *lipH* de *M. smegmatis*. Se muestra el valor de Ct (ciclo umbral) con respecto a la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente (y) y el valor predictivo de confianza (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA (R^2 cercana a 1), respectivamente.

Anexo 4



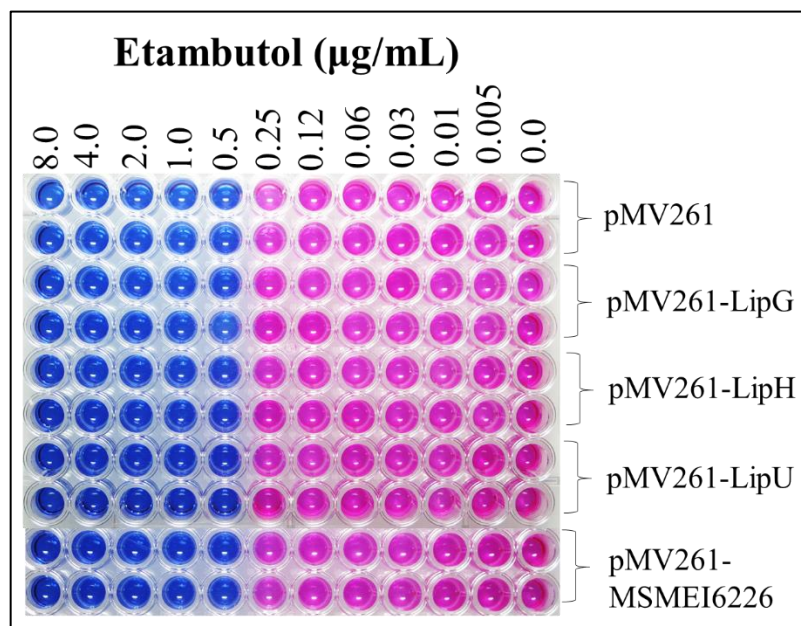
Anexo 4. Estandarización del ensayo para la amplificación del gen *lipU*. A) Rango dinámico de amplificación para el gen *lipU* de *M. smegmatis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA de 1:8 a 1:512. Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de la fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *lipU* (Marcada con el fluoróforo FAM) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (Fluoróforo ROX) menos la línea basal. La línea horizontal representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para análisis cuantitativos. B) Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia del gen *lipU* de *M. smegmatis*. Se muestra el valor de Ct (ciclo umbral) con respecto a la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente (y) y el valor predictivo de confianza (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA (R^2 cercana a 1), respectivamente.

Anexo 5



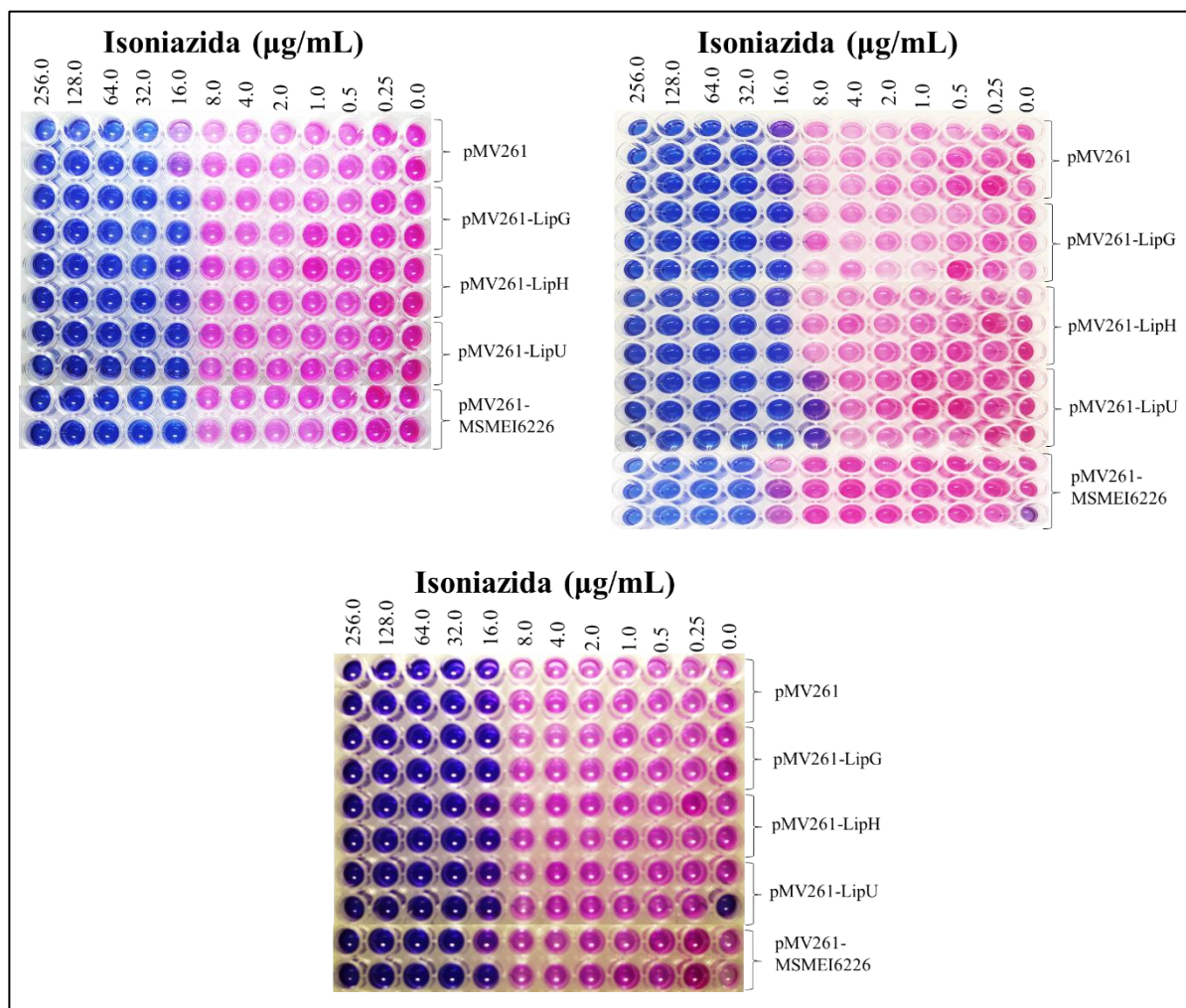
Anexo 5. Estandarización del ensayo para la amplificación del gen MSMEI_6226. A) Rango dinámico de amplificación para el gen MSMEI_6226 de *M. smegmatis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA de 1:8 a 1:512. Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de la fluorescencia de la sonda que reconoce al gen MSMEI_6226 (Marcada con el fluoróforo FAM) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (Fluoróforo ROX) menos la línea basal. La línea horizontal representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para análisis cuantitativos. B) Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia del gen MSMEI_6226 de *M. smegmatis*. Se muestra el valor de Ct (ciclo umbral) con respecto a la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente (y) y el valor predictivo de confianza (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA (R^2 cercana a 1), respectivamente.

Anexo 6



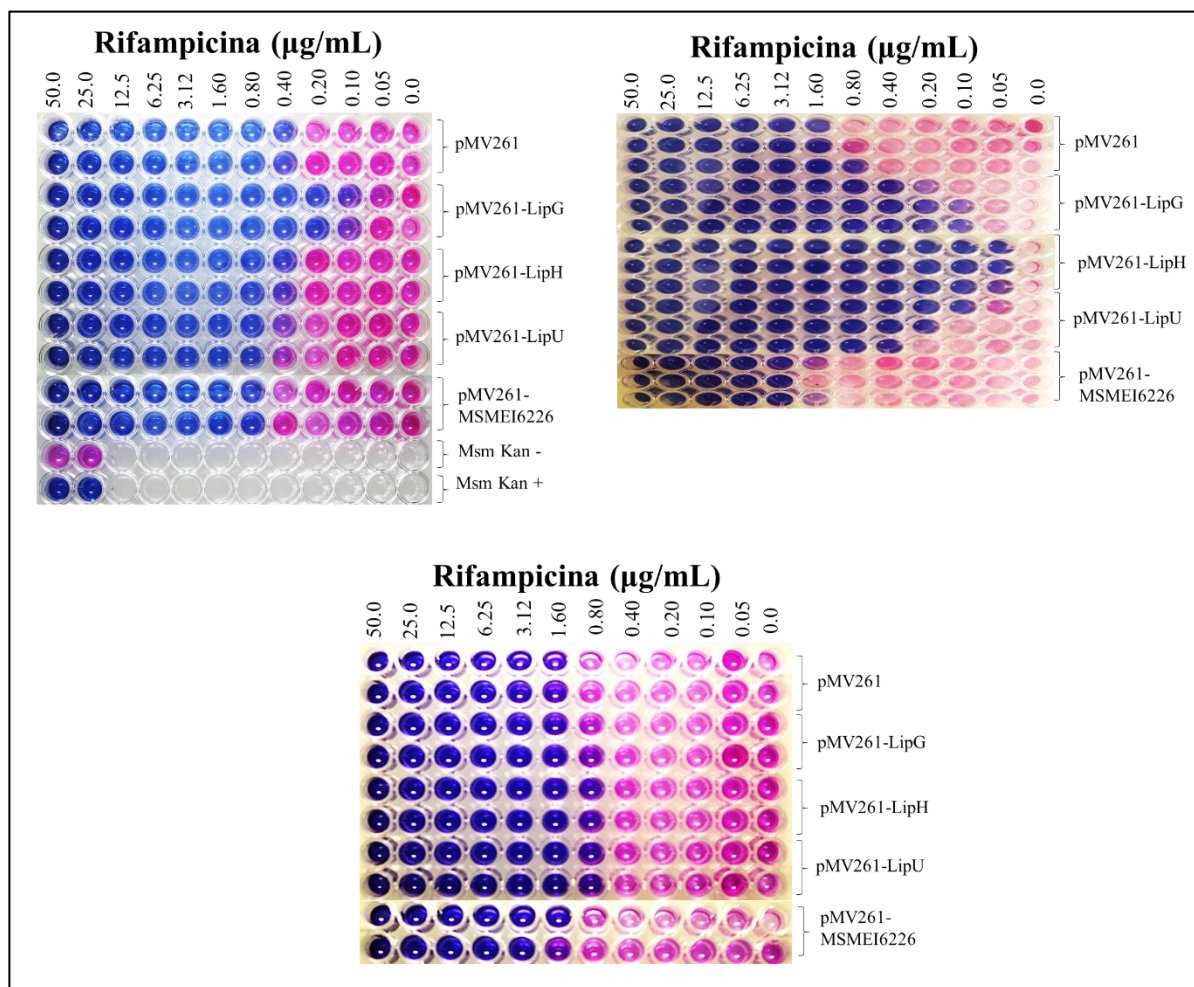
Anexo 6. Evaluación de la sobreexpresión de lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la resistencia a etambutol en *M. smegmatis*. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226. El medio de cultivo de las micobacterias contenía etambutol a las concentraciones indicadas además de 20 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina. Los ensayos fueron realizados por duplicado. El cambio de color de azul a rosa indica crecimiento bacteriano.

Anexo 7



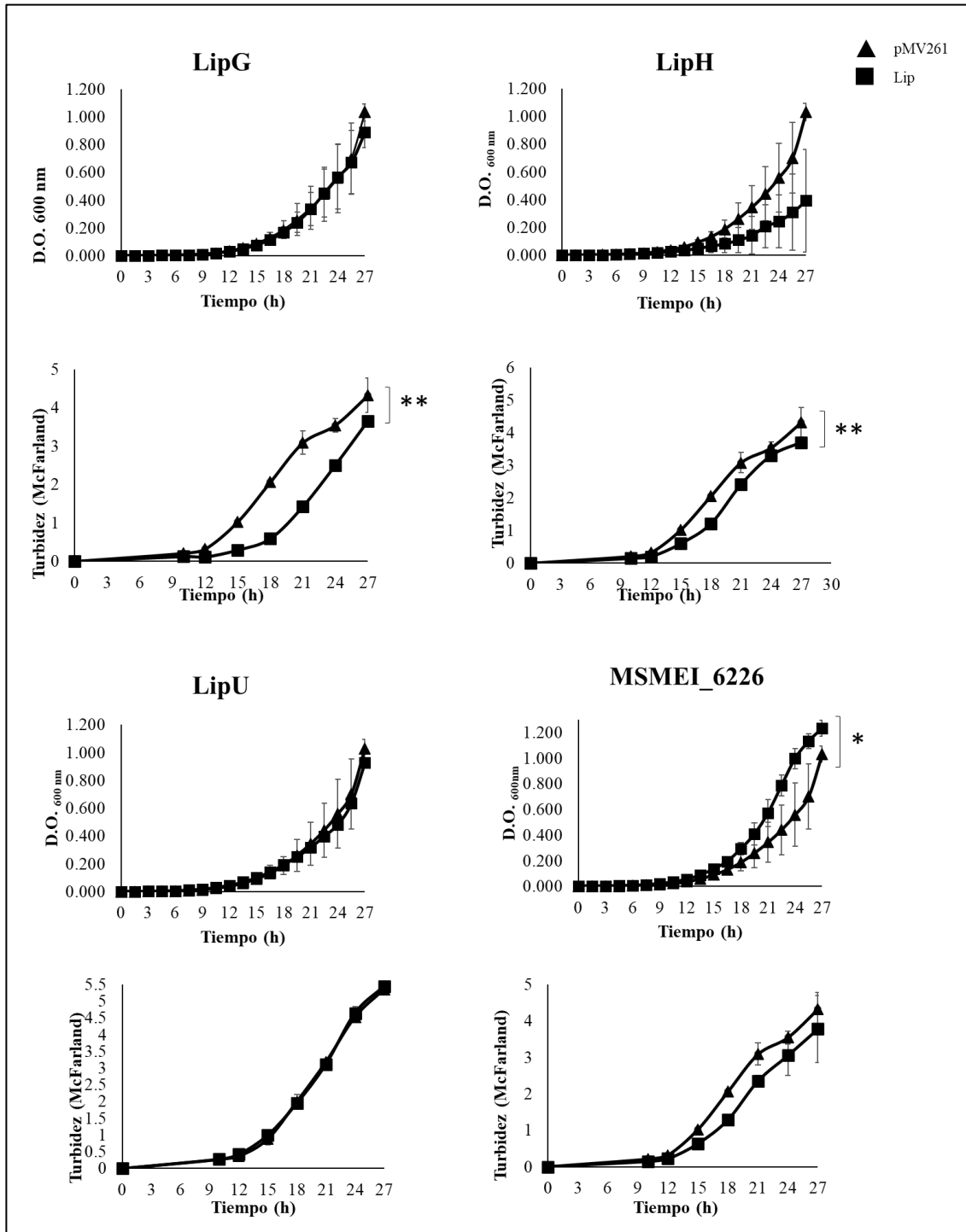
Anexo 7. Evaluación de la sobreexpresión de lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la resistencia a isoniazida en *M. smegmatis*. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226. El medio de cultivo de las micobacterias conteniendo isoniazida a las concentraciones indicadas además de 20 µg/mL de kanamicina. Los ensayos fueron realizados por duplicado o triplicado. El cambio de color de azul a rosa indica crecimiento bacteriano. Se muestran triplicados biológicos.

Anexo 8



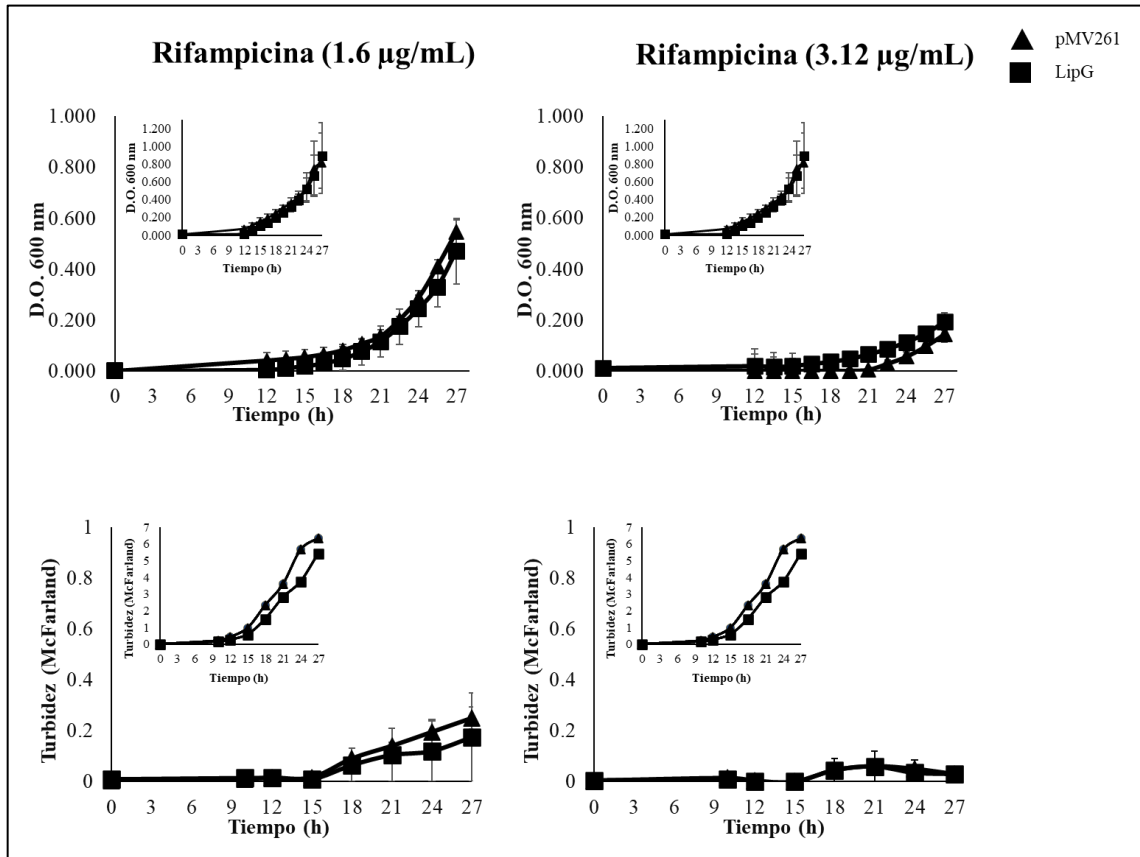
Anexo 8. Evaluación de la sobreexpresión de lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226 en la resistencia a rifampicina en *M. smegmatis*. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de *M. smegmatis* sobreexpresando las lipasas LipG, LipH, LipU y MSMEI_6226. El medio de cultivo de las micobacterias conteniendo rifampicina a las concentraciones indicadas además de 20 µg/mL de kanamicina. Los ensayos fueron realizados por duplicado o triplicado. El cambio de color de azul a rosa indica crecimiento bacteriano. Se muestran triplicados biológicos.

Anexo 9



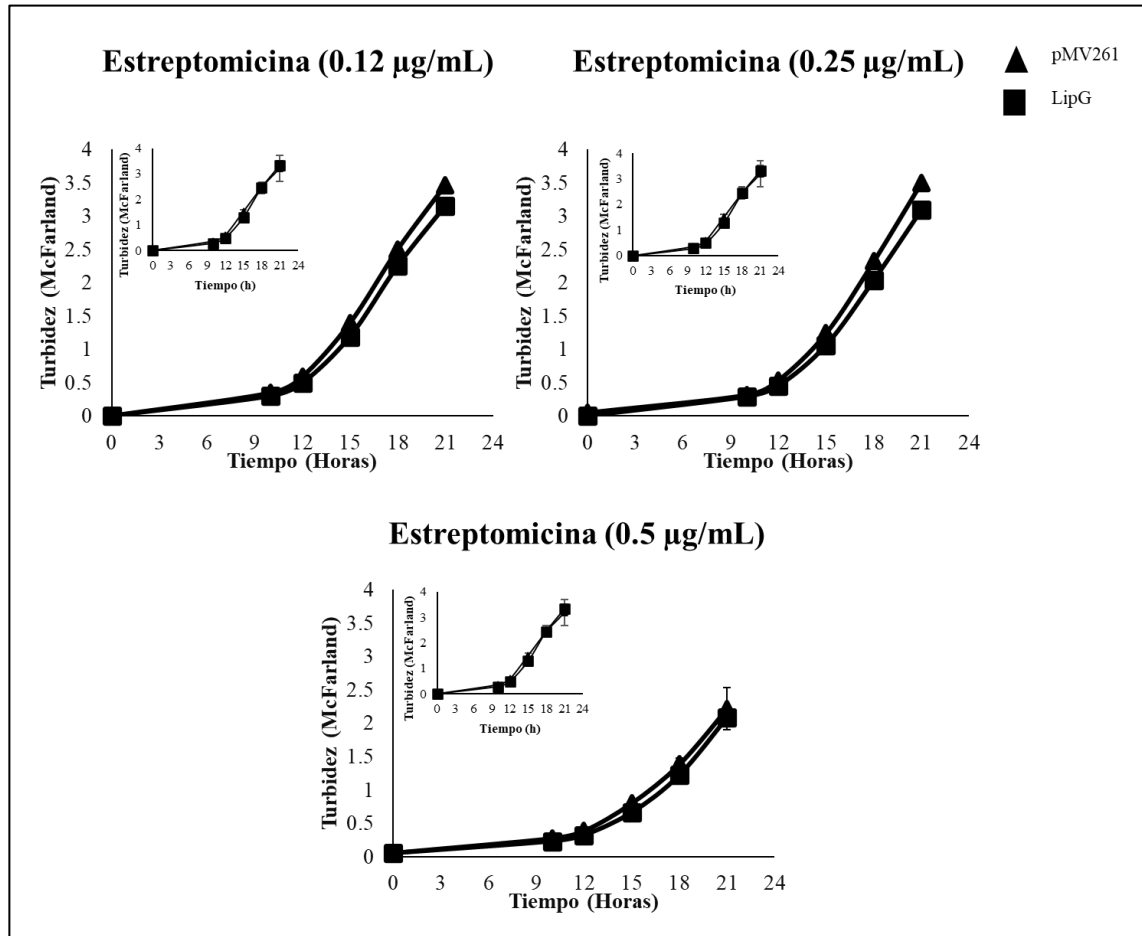
Anexo 9. Cinética de crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando lipasas en medio conteniendo kanamicina como fármaco de selección. Medio 7H9 conteniendo kanamicina a 20 µg/mL. Ensayo realizado por duplicado y triplicado técnico, mostrando desviación estándar. Ensayo realizado por D.O. y McF. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 10



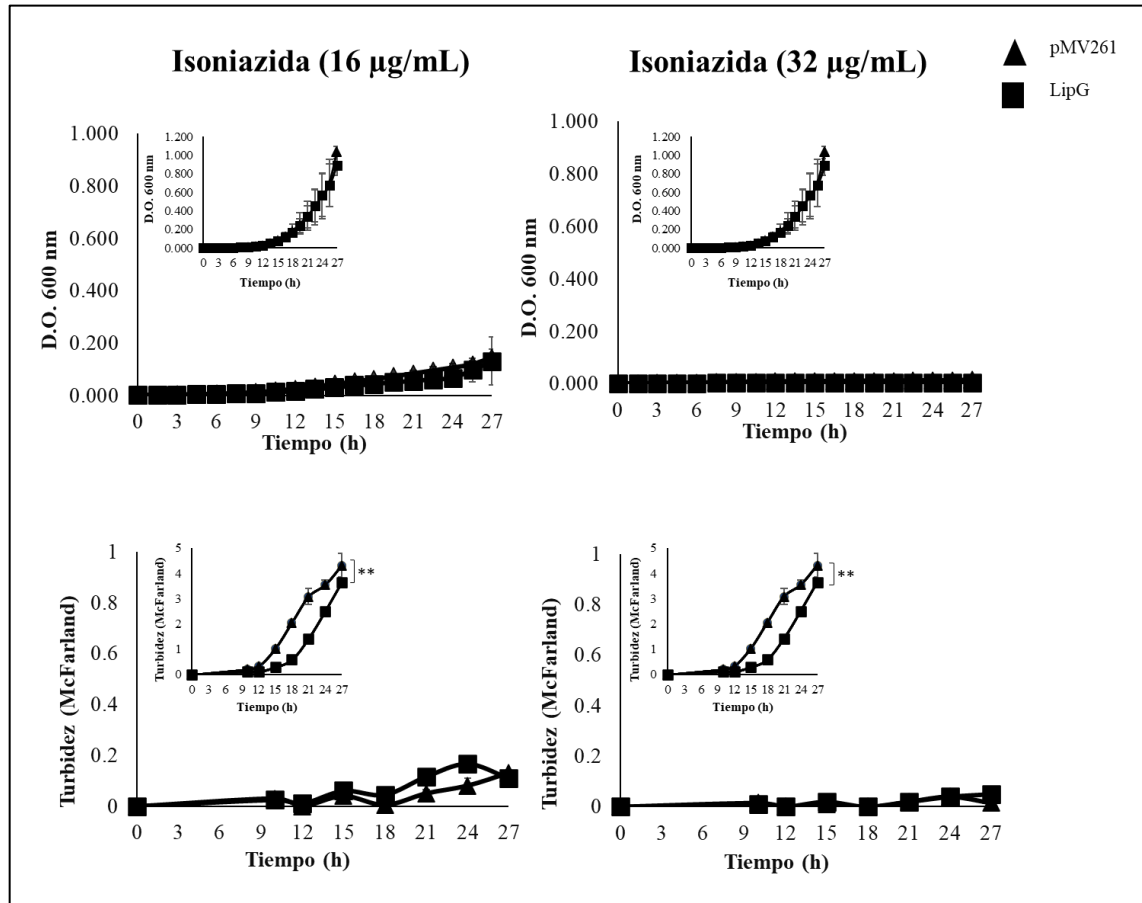
Anexo 10. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipG en medio líquido conteniendo el fármaco RIF. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de RIF. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico, en McF y D.O. respectivamente, mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 11



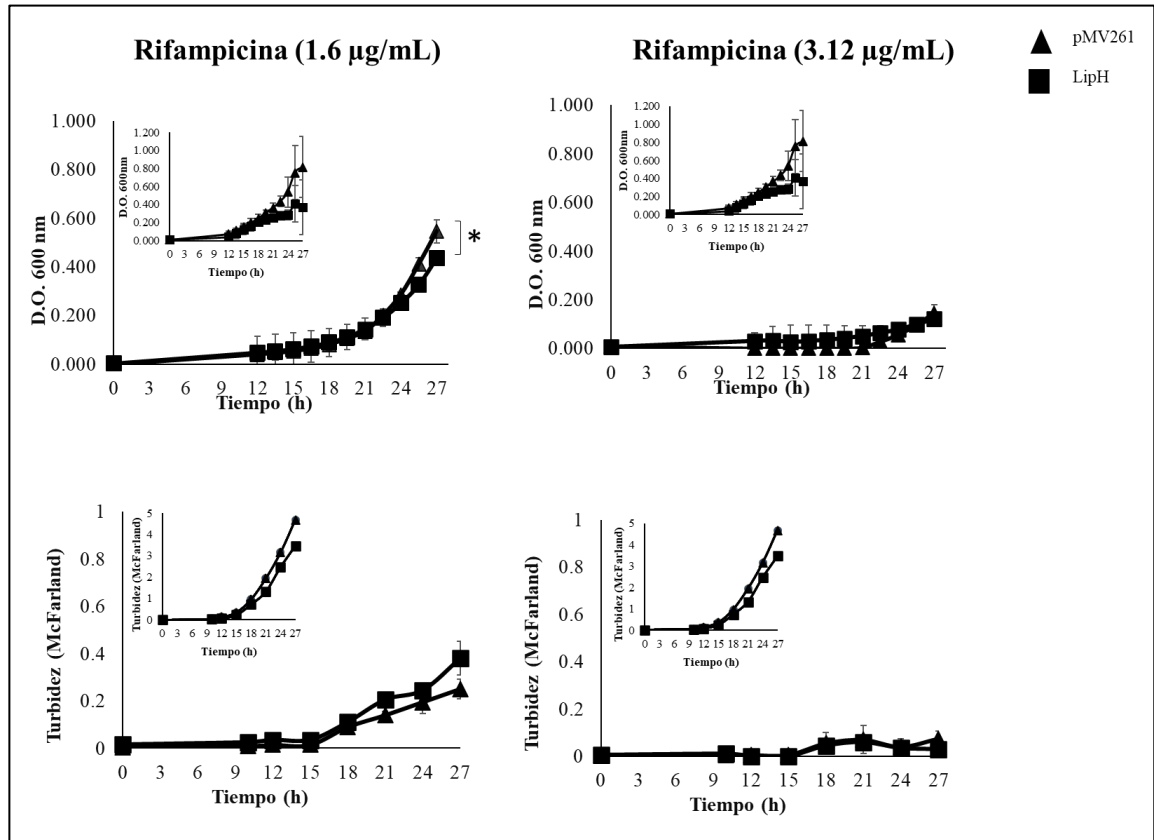
Anexo 11. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipG en medio líquido conteniendo el fármaco STR. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y conteniendo 20 µg/mL de kanamicina. Ensayo realizado por duplicado mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 12



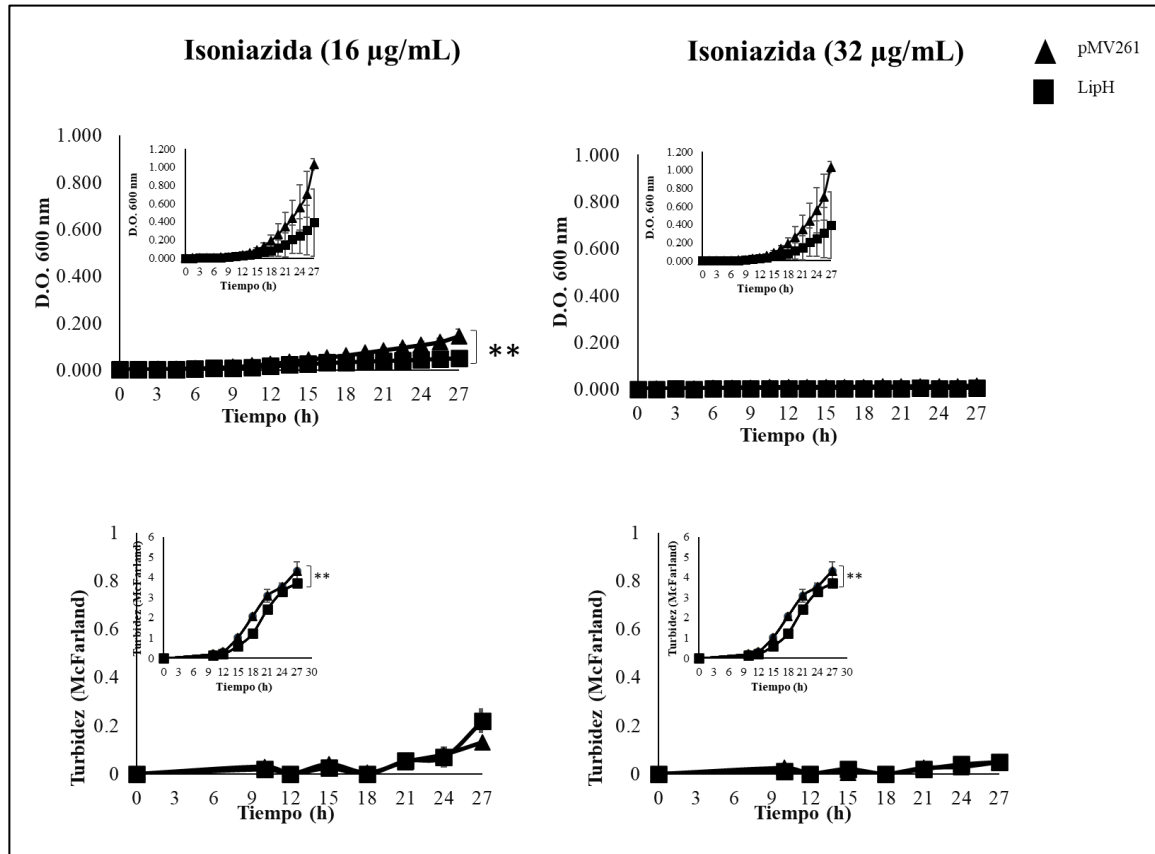
Anexo 12. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipG en medio líquido conteniendo el fármaco INH. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de INH. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 13



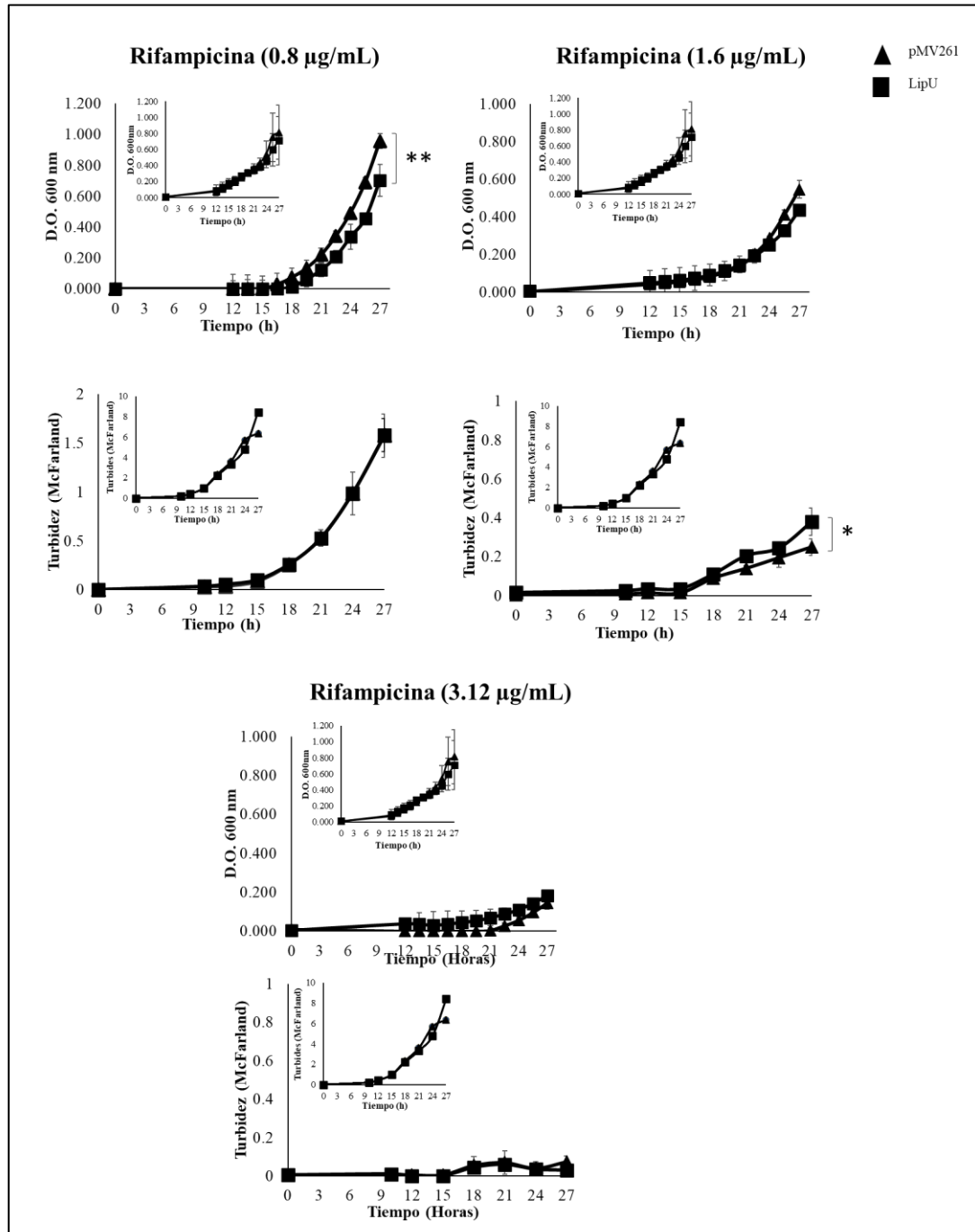
Anexo 13. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH en medio líquido conteniendo el fármaco RIF. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de RIF. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 14



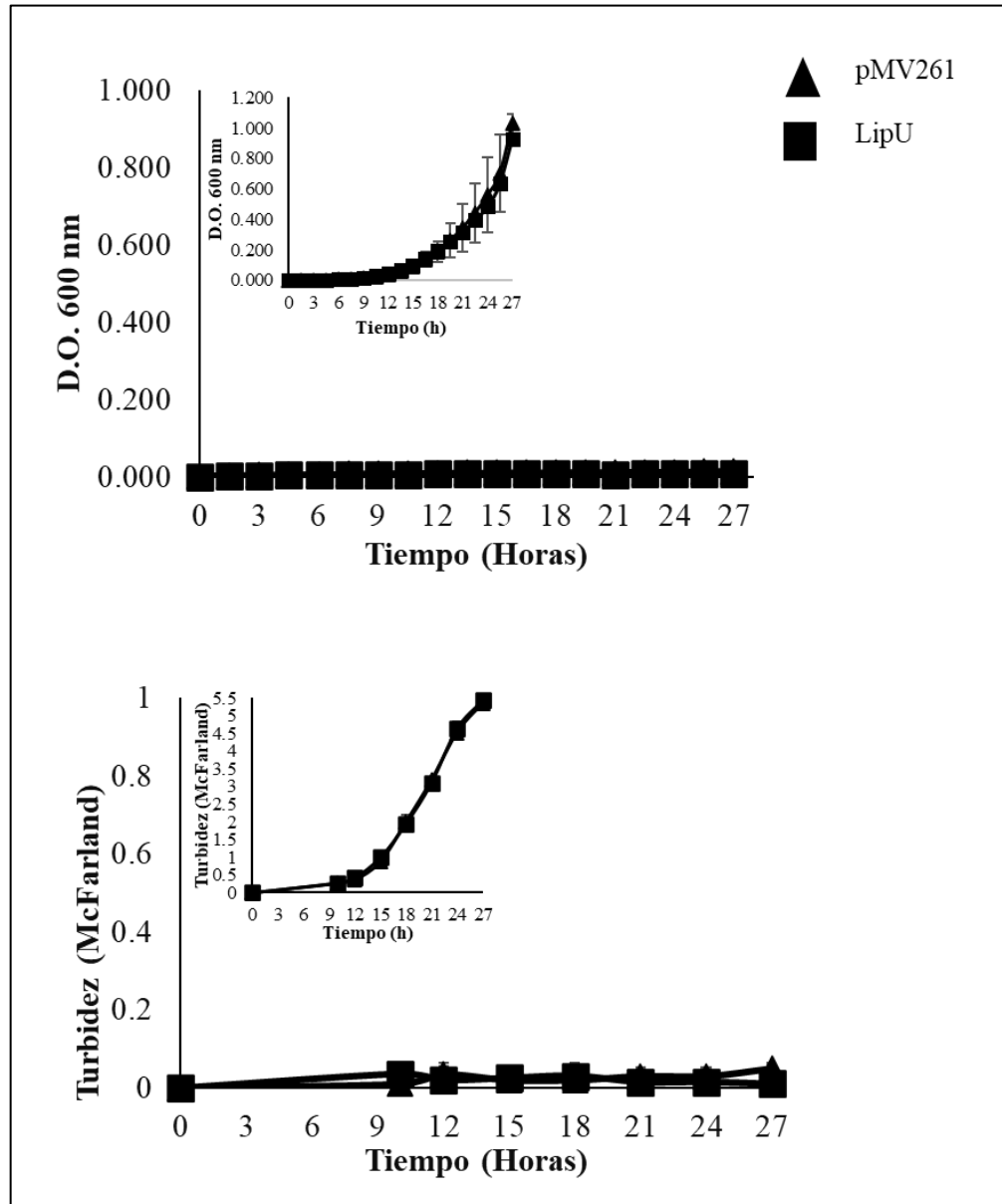
Anexo 14. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipH en medio líquido conteniendo el fármaco INH. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de INH. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 15



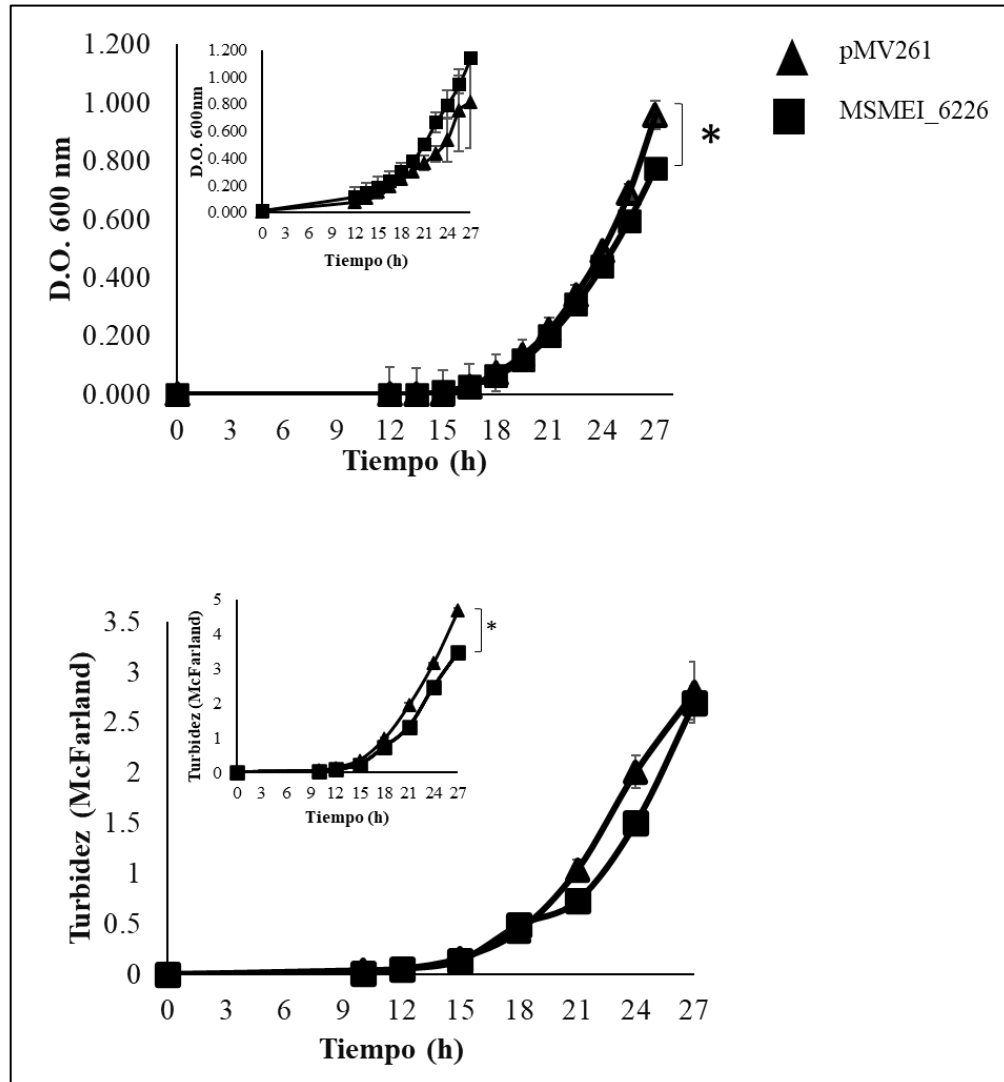
Anexo 15. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipU en medio líquido conteniendo el fármaco RIF. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de RIF. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico mostrando desviación estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Anexo 16



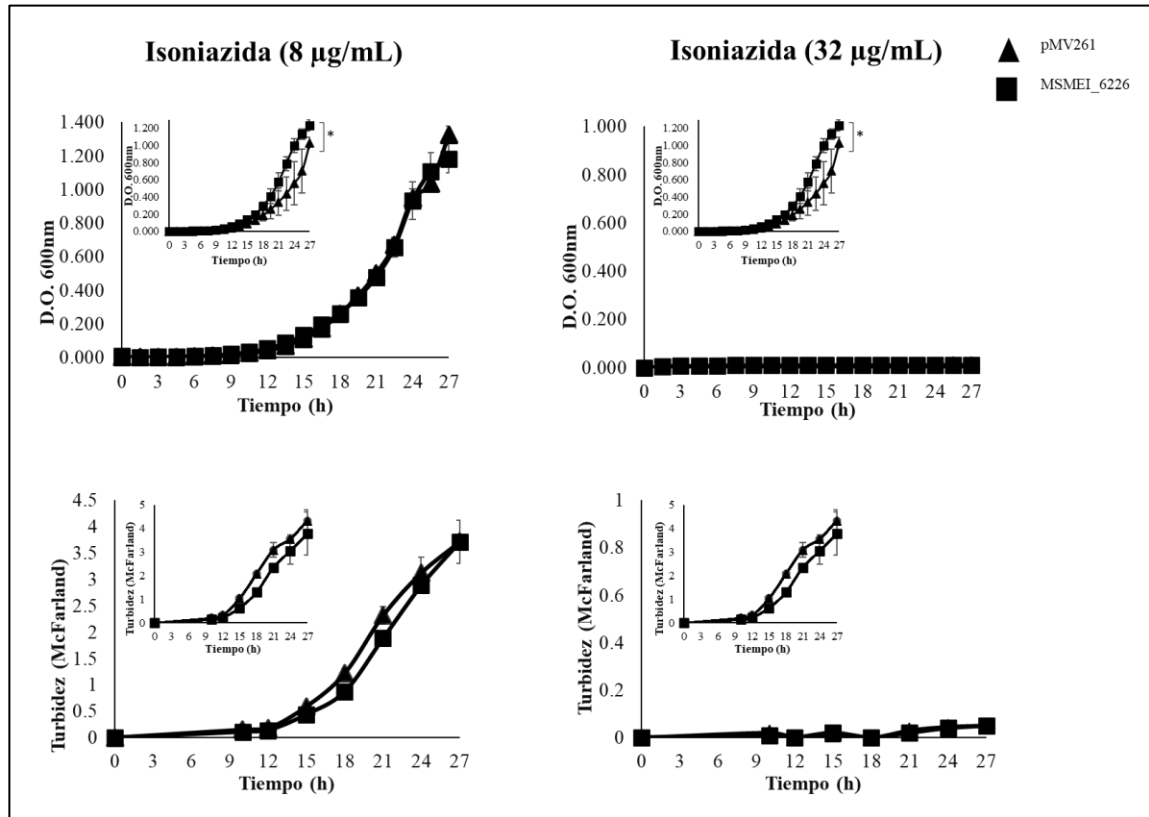
Anexo 16. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando LipU en medio líquido conteniendo el fármaco INH. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más la concentración de 32 µg/mL de INH. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico mostrando desviación estándar. * $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 17



Anexo 17. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando MSMEI_6226 en medio líquido conteniendo el fármaco RIF. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/ml de kanamicina más la concentración de 8 µg/ml de RIF. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 18



Anexo 18. Crecimiento de *M. smegmatis* sobreexpresando MSMEI_6226 en medio líquido conteniendo el fármaco INH. El ensayo fue realizado en medio 7H9 suplementado con ADC y con 20 µg/mL de kanamicina más las concentraciones indicadas de INH. Imagen superior izquierda indica el crecimiento sin fármacos. Ensayo realizado por triplicado y duplicado técnico mostrando desviación estándar. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Anexo 19



Anexo 19. Constancia congreso nacional Abril 2017

Anexo 20

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Delegación Nuevo León

Jefatura de Prestaciones Médicas



Otorga el presente

CONSTANCIA

a:

Arriaga-Guerrero Ana Leticia, Silva-Ramírez Beatriz, Bermúdez de León Mario Abelardo,
Hernández-Luna Carlos Eduardo, Peñuelas-Urquides Katia

Por la presentación de trabajo en Cartel titulado:

Sobreexpresión de lipasas potencialmente vinculadas a la resistencia a fármacos en tuberculosis

XXII Foro Delegacional de Investigación
Ceremonia del 75 aniversario del IMSS
Monterrey, N. L. a 19 de enero del 2018
(duración 12 horas)


Dra. Irazema L. Hernández Mancinas
Coord. de Planeación y Enlace Institucional


Dra. Ma. Guadalupe Garza Ságastegui
Titular Delegacional de Servicios de Prestaciones Médicas



Anexo 18. Constancia congreso regional Enero 2018.

Anexo 21



XXVI Foro Nacional
de Investigación en
Salud, Zacatecas, Zac.

Investigación en Inflamación:
Aplicación en la Medicina del Siglo XXI
4 al 7 de septiembre de 2018.

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Otorga la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación

EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LIPF EN LA FARMACORESISTENCIA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Autor(es): Arriaga-Guerrero Ana Leticia, González-Escalante Laura Adiene, Villarreal-Treviño Licet, Silva-Ramírez Beatriz, Bermúdez-De León Mario Abelardo, Peñuelas-Urquides Katia.



Dr. Hugo García Aranda
Jefe de los Servicios de Prestaciones Médicas
Delegación Zacatecas
Instituto Mexicano del Seguro Social



Lic. Rafael Estrada Cabral
Delegado Estatal
Delegación Zacatecas
Instituto Mexicano del Seguro Social



Dr. Francisco Luna Pacheco. MSP
Coordinador del Área de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Zacatecas



Anexo 21. Constancia congreso regional Septiembre 2018.

Anexo 22



**asm
microbe
2019**

JUNE 20 – 24 • SAN FRANCISCO, CA
(<https://www.asm.org/Events>)

Session P504 - AAR01 - Surveillance of Antimicrobial Resistance in Community-acquired Bacterial Pathogens and Commensals

[Itinerary](#)

SATURDAY - AAR-568 / SATURDAY - AAR-568 - **Effect of *Mycobacterium* Lipases in Drug Resistance**

 June 22, 2019, 10:30 AM - 5:00 PM	 Exhibit and Poster Hall
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>Presentation Time 1: 11 am-12 pm</p> <p>Presentation Time 2: 4 pm - 5 pm</p>	<p>Authors</p> <p>A. L. Arriaga-Guerrero¹, C. E. Hernández-Luna¹, L. A. González-Escalante², B. Silva-Ramírez², B. C. Weinrick³, W. R. Jacobs, Jr.³, M. A. Bermúdez de León², K. Peñuelas-Urquides²; ¹Univ. Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Mexico, ²Centro de Investigación Biomedica del Noreste, Monterrey, Mexico, ³Albert Einstein Coll. of Med., Bronx, NY</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Anexo 22. Constancia congreso Internacional Junio 2019.

Anexo 23



Anexo 23. Diploma mejor cartel del foro de seminarios Diciembre 2017

Anexo 24



Anexo 24. Diploma mejor cartel del foro de seminarios Diciembre 2018.

Anexo 25



Anexo 25. Diploma mejor cartel del foro de seminarios Junio 2019.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

LipF increases rifampicin and streptomycin sensitivity in a *Mycobacterium tuberculosis* surrogate



Ana Leticia Arriaga-Guerrero^{1,2}, Carlos E. Hernández-Luna², Joyce Rigal-Leal², Rene J. Robles-González², Laura Adlene González-Escalante¹, Beatriz Silva-Ramírez³, Roberto Mercado-Hernández², Javier Vargas-Villarreal⁴, Mario Bermúdez de León¹ and Katia Peñuelas-Urquides^{1*}

Abstract

Background: Mortality due to tuberculosis (TB) has increased due to the development of drug resistance, the mechanisms of which have not been fully elucidated. Our research group identified a low expression of *lipF* gene in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with drug resistance. The aim of this work was to evaluate the effect of lipase F (LipF) expression on mycobacterial drug resistance.

Results: The effects of expressing *lipF* from *Mycobacterium tuberculosis* in *Mycobacterium smegmatis* on resistance to antituberculosis drugs were determined with resazurin microtiter assay plate and growth kinetics. Functionality of ectopic LipF was confirmed. LipF expression reduced the rifampicin (RIF) and streptomycin (STR) minimum inhibitory concentration (MIC) from 3.12 µg/mL to 1.6 µg/mL and 0.25 µg/mL to 0.06 µg/mL, respectively, moreover a reduced *M. smegmatis* growth in presence of RIF and STR compared with that of a control strain without LipF expression ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) was shown.

Conclusions: LipF expression was associated with increased RIF and STR sensitivity in mycobacteria. Reduced LipF expression may contribute to the development of RIF and STR resistance in *Mycobacterium* species. Our findings provide information pertinent to understanding mycobacterial drug resistance mechanisms.

Keywords: *Mycobacterium*, Tuberculosis, Rifampicin-resistance, Streptomycin-resistance, LipF, lipases

Background

Mycobacterium tuberculosis is the main causative agent of tuberculosis (TB), which is the leading cause of mortality due to infection worldwide. In 2017, there was an estimated of 10 million TB cases and 1.3 million deaths [1]. The first antibiotic discovered to treat tuberculosis in 1947 was streptomycin (STR) [2], this drug acts inhibiting protein synthesis through 30S ribosomal subunit inhibition [3]. For many years this drug was used in

monotherapy in TB treatment therefore high drug-resistance levels appeared and the incorporation of different antibiotics to the treatment scheme became necessary [4]. STR use is recommended as part of the second-line treatment regimen and only when amikacin is not available or its resistance had been confirmed [5]. Nowadays, the standard TB treatment includes antimicrobial drugs such as rifampicin (RIF), isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA), and ethambutol (EMB) [1]. RIF is a semisynthetic molecule produced in *Streptomyces mediterranei* with broad spectrum antibacterial activity. Its mechanism of action consists in the inhibition of RNA polymerase activity by forming a stable complex

* Correspondence: katia.penuelas@imss.gob.mx

¹Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.